

Rio de Janeiro, RJ / Fevereiro, 2026

Redução de escala em métodos de análise de qualidade para lúpulo

Humberto Ribeiro Bizzo⁽¹⁾, Maria de Lourdes Mendes de Souza⁽²⁾, Paola Ervatti Gama⁽²⁾, Marcos José de Oliveira Fonseca⁽¹⁾ Rosemar Antoniassi⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pesquisadores, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro RJ. ⁽²⁾ Analistas, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro RJ.

Resumo — O lúpulo (*Humulus lupulus* L., espécie da família Cannabaceae) é um dos ingredientes obrigatórios na fabricação da cerveja, responsável por boa parte das características sensoriais do produto final. A qualidade do lúpulo é avaliada pelo teor e composição de seu óleo essencial (aroma) e pelo teor de alfa ácidos e beta ácidos, responsáveis pelo amargor da bebida. Neste trabalho foi avaliada a redução na quantidade de lúpulo usada nas análises, objetivando a redução de custo tanto com a matéria-prima como com o volume de solventes utilizados no processo de extração. Foi comparada a separação dos alfa e beta ácidos por cromatografia líquida, na eluição isocrática e por gradiente. Foi possível reduzir em 90% a quantidade de lúpulo e o volume de solventes na determinação dos alfa ácidos e beta ácidos, e de 80% a 90% a quantidade de lúpulo necessária à obtenção do óleo essencial, sem diferenças significativas em comparação com os métodos oficiais de análise da *American Brewing Chemists Society* e, assim, reduzir custos, geração de resíduos e tempo de análise. As alterações propostas nestes métodos de análise da qualidade do lúpulo têm impacto principalmente na redução da quantidade desta matéria-prima de alto valor agregado, beneficiando os produtores.

Termos para indexação: *Humulus lupulus*, óleo essencial, alfa ácidos, beta ácidos, humulonas, lupulonas.

Scale-down methods for hop quality analysis

Abstract — Hops (*Humulus lupulus* L., species of Cannabaceae family) are one of the essential ingredients in beer production, responsible for many of the sensory characteristics of the final product. The quality of hops is assessed by the content and composition of their essential oil (aroma) and by the content of alpha acids and beta acids, which are responsible for the bitterness of the brew. This study evaluated the reduction in the quantity of hops used in the analyses, aiming to reduce costs both in terms of raw materials and the volume of solvents used in the extraction process, which reduces the generation of waste for disposal. The separation of alpha and beta acids by liquid chromatography using isocratic or gradient elution was compared. It was possible to reduce the amount of hop and the volume of solvents used in the determination of alpha acids and beta acids by 90%, and the amount of

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501
Guaratiba - 23020-470
Rio de Janeiro, RJ
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Karina Maria Olbrich dos Santos

Secretária-executiva
Virgínia Martins da Matta

Membros
Andréa Madalena Maciel Guedes,
Celma Rivanda Machado de
Araújo, Edmar das Mercês Penha,
Elizabete Alves de Almeida
Soares, Janice Ribeiro Lima,
Melicia Cintia Galdeano e Otniel
Freitas Silva

Edição executiva
Janice Ribeiro Lima

Revisão de texto
Janine Passos Lima

Normalização bibliográfica
Celma Rivanda Machado de
Araújo (CRB-07/5517)

Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio

Diagramação
Marcos de Oliveira Molin

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

hop needed to obtain the essential oil by 80 to 90%, with no significant differences compared to the official analysis methods of the American Brewing Chemists Society, thus reducing costs, waste generation, and analysis time. The proposed changes to hop quality analysis also impact the reduction in the quantity of this high-value raw material, benefiting producers.

Index terms: *Humulus lupulus*, essential oil, alpha acids, beta acids, humulones, lupulones.

Introdução

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), uma liana da família Cannabaceae, é um dos ingredientes obrigatórios da cerveja, juntamente com o malte (ou outra fonte de carboidratos), a água e o fermento (Brasil, 2019). Os maiores produtores de lúpulo são os Estados Unidos da América e a Alemanha com cerca de 75-80% da produção mundial (Durello; Silva; Bogus Junior, 2019). Algumas tentativas de introdução do lúpulo foram realizadas no Brasil durante o último quarto do século XIX, mas somente recentemente essa cultura alcançou sucesso comercial. Diversas variedades foram introduzidas no sul do país, bem como nas áreas montanhosas dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, pois o crescimento do mercado de cervejarias artesanais estimulou o cultivo de lúpulo (Marcondes et al., 2024).

A qualidade do lúpulo é avaliada por seu teor de humulonas e lupulonas, mais conhecidas como alfa ácidos e beta ácidos (respectivamente), que conferem o amargor da bebida, bem como pelo teor e composição de seu óleo essencial, responsável por boa parte dos aromas do produto (Durello; Silva; Bogus Junior, 2019; Souza et al., 2024). O lúpulo produz anualmente inflorescências que são chamadas de cones e a sua composição química depende da variedade, das condições climáticas e do solo, bem como das condições de cultivo e práticas culturais, da idade da planta, colheita e pós-colheita (Fortuna et al., 2023).

Os métodos analíticos empregados na indústria são aqueles da American Society of Brewing Chemists (ASBC), que descrevem extração seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os alfa ácidos e beta ácidos (American Society of Brewing Chemists, 2011a), e destilação (American Society of Brewing Chemists, 2011b) seguida de cromatografia em fase gasosa (CG) para o óleo essencial (American Society of Brewing Chemists, 2011c).

Os métodos de determinação de alfa e beta ácidos e o de destilação do óleo essencial utilizam quantidades elevadas de lúpulo por análise, com 10 gramas (American Society of Brewing Chemists, 2011a) e 100 gramas (American Society of Brewing Chemists, 2011b), respectivamente. Vale ressaltar que, para ensaios em triplicata, essas quantidades são três vezes maiores, o que impacta diretamente o custo da análise para os produtores e cervejarias, já que o lúpulo é um produto de valor elevado. Além disso, o método de determinação de humulonas e lupulonas utiliza solventes orgânicos para sua extração, com consequente geração de resíduos tóxicos. Por conta dessas questões, foi estudada a redução de escala para os dois métodos, com menor quantidade de lúpulo e, portanto, com menor custo da análise e geração de resíduos tóxicos.

A produção de cones de lúpulo no Brasil está se estabelecendo em diversas áreas e muitas variedades estão sendo avaliadas quanto à produtividade. A qualidade do lúpulo é avaliada pela composição e pelos teores de óleo essencial e de alfa e beta ácidos, que são determinantes nos diferentes tipos de cerveja. Assim, o monitoramento da qualidade dos cones é fundamental para a seleção das variedades mais promissoras, na avaliação das condições de cultivo, bem como na demanda da indústria cervejeira.

Material e métodos

Material

Foram utilizados como matéria-prima cones de lúpulo cultivados no município de Fartura, estado de São Paulo (23° 23' 38" Sul, 49° 30' 55" Oeste). A secagem do material foi realizada em secador de bandejas com convecção forçada na temperatura do ar de 40 °C, até que a umidade fosse menor que 10%. Para a realização dos ensaios foi obtida uma amostra com peso final de 1 kg.

Destilação do óleo essencial

A destilação foi testada com 10 g, 15 g, 20 g e 100 g de lúpulo, esta última como controle, em quatro repetições cada. Para cada teste de redução de quantidade, o lúpulo (cones sem triturar) foi adicionado em um balão de fundo redondo de 250 mL. Em seguida, foram adicionados 150 mL de água destilada ao balão. No caso do ensaio com 100 g, foi utilizado um balão com capacidade de 3 litros ao qual foram adicionados 1500 mL de água destilada. Em seguida, um destilador ou aparelho de Clevenger (Figura 1), o mesmo utilizado nos métodos das Farmacopeias Europeia e Brasileira

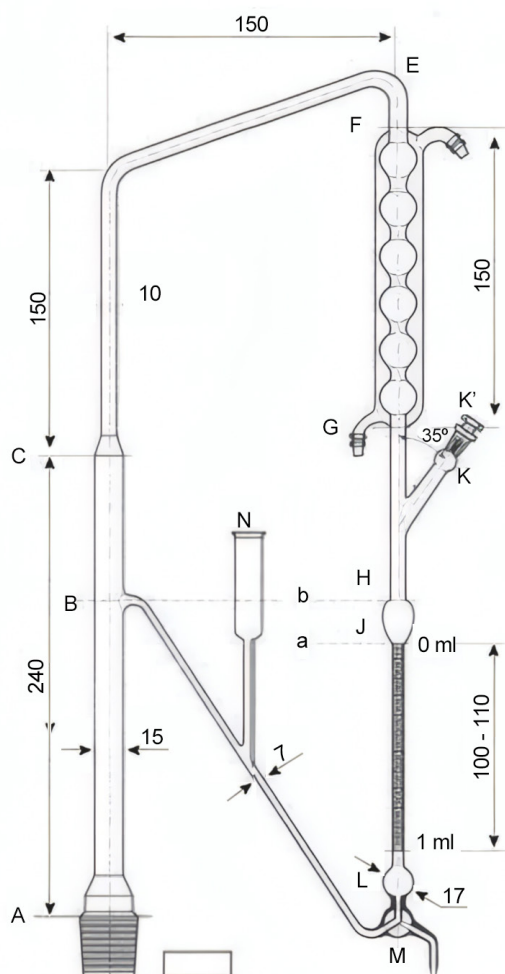


Figura 1. Destilador ou aparelho de Clevenger. Fonte: Farmacopeia Brasileira, 6ª ed.

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019), foi conectado ao balão por meio da junta A. Uma quantidade pequena de água, cerca de 1 a 2 mL, foi adicionada no destilador por meio da abertura K, para evitar que o óleo essencial ficasse preso no fundo da vidraria.

Com a aparelhagem montada (Figura 2), a água do balão foi aquecida até a ebulição. A destilação foi mantida por 2 horas. Terminada a destilação, e após o resfriamento do aparelho, o volume do óleo foi lido na escala do destilador. Em seguida, o óleo foi removido do destilador pela torneira de escoamento M. O óleo foi seco sobre sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco selado em geladeira até a análise.

Análise do óleo essencial por CG

Pesou-se cerca de 0,01 g do óleo em frasco de 2 mL, adicionou-se 50 µL de uma solução do padrão interno (octanoato de metila) e ajustou-se o volume para 1 mL com hexano. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo Agilent (Palo Alto,

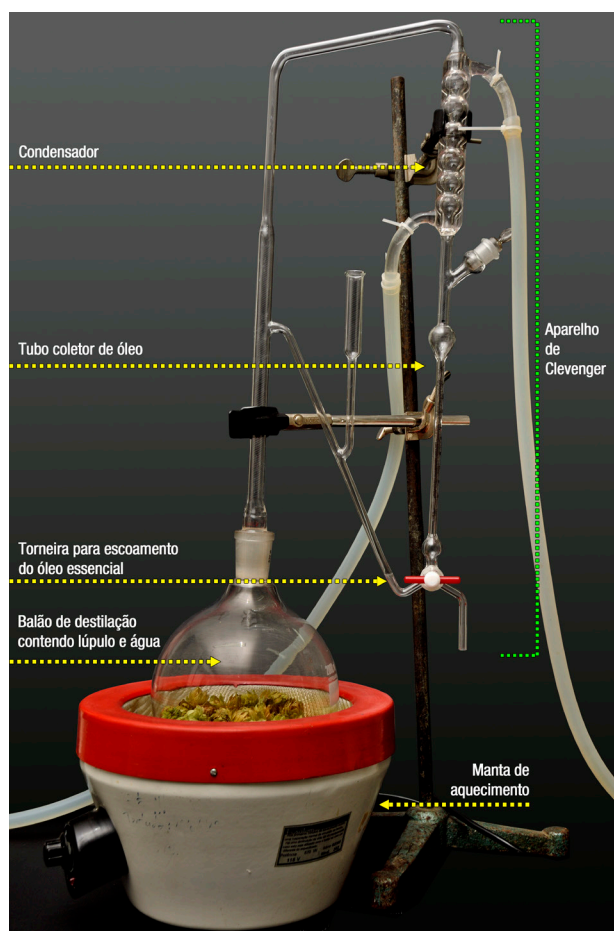


Foto: Marcelly C.S. Santos

Figura 2. Foto do sistema de destilação montado no laboratório.

CA) modelo 7890B equipado com um detector de ionização de chama e um amostrador automático Agilent 7693B. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (5% fenil-95% metilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada para variar de 60 °C a 240 °C, a 3 °C/minuto. O detector foi operado a 280 °C e o injetor a 250 °C. O hidrogênio foi usado como gás carreador (1,5 mL/minuto). Foi injetado 1,0 µL da solução da amostra no modo split (1:50). As áreas da resposta do sinal do detector de ionização por chama foram normalizadas pelo padrão interno e corrigidas pelos fatores de resposta teóricos (Cachet et al., 2016).

Para a identificação dos constituintes, as amostras foram também analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em um sistema Agilent 7890A com detector seletivo de massas Agilent 5975C, utilizando a mesma coluna capilar e condições de operação descritas anteriormente, substituindo-se o gás carreador por hélio (1,0 mL/minuto). O detector de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV. A linha de transferência foi aquecida a 260

°C. A fonte de ionização e o analisador operaram a 200 °C e 150 °C, respectivamente. Foram monitoradas as massas de 40 a 350 Da, com taxa de 3,15 varreduras/segundo.

Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca NIST do equipamento, bem como por seus índices de retenção, calculados após a injeção de uma solução de alcanos nas mesmas condições (Van den Dool; Kratz, 1963). Os cálculos utilizaram planilhas Excel programadas no laboratório (Bizzo et al., 2020).

Extração dos alfa ácidos e beta ácidos

A análise foi realizada de acordo com a norma da ASBC (American Society of Brewing Chemists, 2011a), pesando-se 10 g de lúpulo finamente triturado em Erlenmeyer, ao qual foram adicionados 20 mL de metanol (grau HPLC) e 100 mL de éter etílico PA. O frasco foi tampado e a agitação foi realizada em agitador orbital (shaker) à temperatura ambiente, durante 30 minutos. O Erlenmeyer foi cuidadosamente aberto e foram adicionados 40 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M, seguindo-se mais 10 minutos de agitação. Após 10 minutos em repouso para a separação de fases, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume do balão foi completado com metanol. Os extratos foram homogeneizados e uma alíquota

foi centrifugada e transferida para um frasco para injeção no cromatógrafo.

Na análise com redução de massa de amostra e volume de solvente, foram testados dois procedimentos de extração. No primeiro, 1 g de lúpulo triturado foi pesado em tubo Falcon de 50 mL ao qual foram adicionados 2 mL de metanol e 10 mL de éter etílico. A amostra foi agitada por 30 minutos em agitador orbital, à temperatura ambiente. Foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M e agitou-se por mais 10 minutos. A amostra permaneceu em repouso por 10 minutos e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 5 mL completando-se o volume com metanol. O extrato foi homogeneizado e uma alíquota foi centrifugada e transferida para um frasco para injeção no cromatógrafo.

No segundo procedimento com redução de massa e volume de solvente, 1 g de lúpulo triturado foi pesado em tubo Falcon de 50 mL, ao qual foram adicionados 2 mL de metanol e 10 mL de éter etílico. A amostra foi então agitada em vórtex por 1 minuto, e o tubo foi mantido em banho de ultrassom à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M, seguido de agitação em vórtex por 30 segundos e banho de ultrassom por 1 minuto. Após 10 minutos de repouso, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o

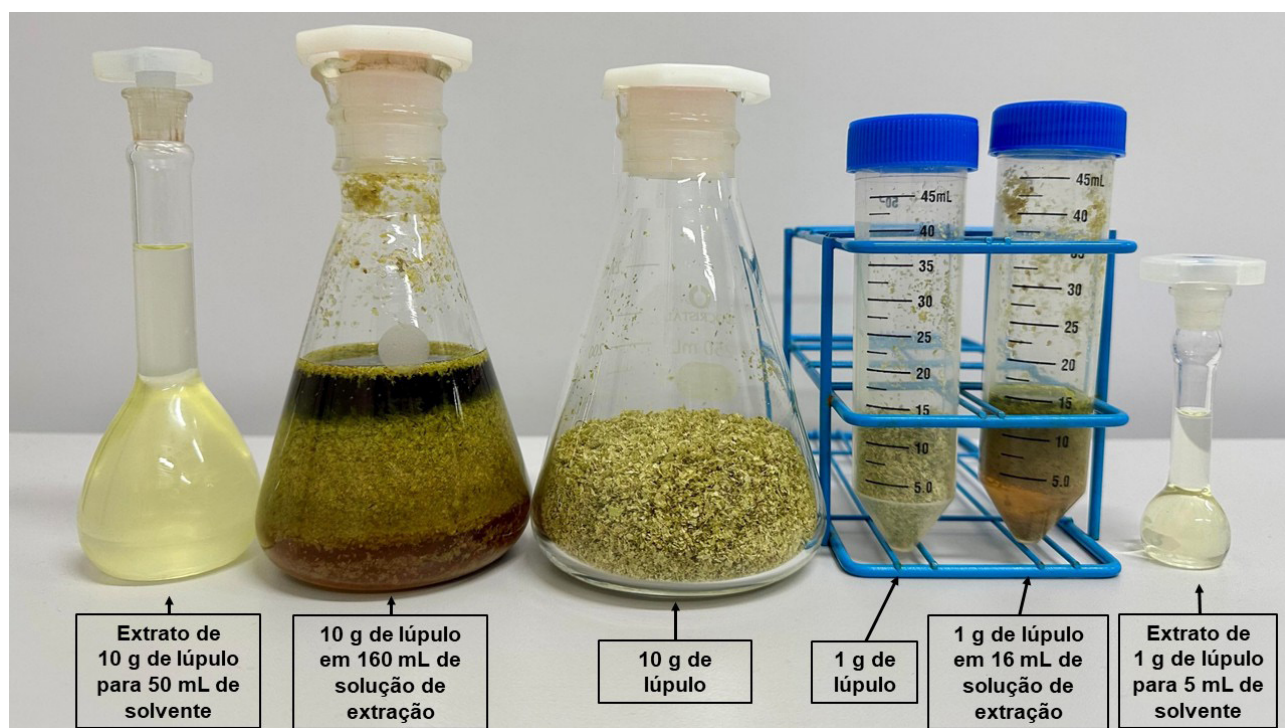


Foto: Maria de Lourdes M. Souza

Figura 3. Comparação entre condições de extração de lúpulo com 10 e 1 grama.

volume com metanol. O extrato foi homogeneizado e uma alíquota foi centrifugada e transferida para um frasco para injeção no cromatógrafo. As diferenças entre pesos e volumes de solvente utilizados nesta comparação podem ser avaliadas na imagem da Figura 3.

Análise de alfa ácidos e beta ácidos por CLAE

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento Alliance Waters modelo 2695, com detector de arranjo de fotodiodos Waters modelo 2996 (comprimento de onda de 330 nm), controlado por software Empower. Foi utilizada uma coluna Thermo BDS Hipersil C18 (100 mm x 4,6 mm com partículas de 2,4 µm). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/minuto, a temperatura da coluna foi 40°C e o volume de injeção de 10 µL. Foi avaliada, inicialmente, uma fase móvel similar à recomendada na norma do ASBC (American Society of Brewing Chemists, 2011a), com eluição isocrática na seguinte composição: água:metanol:ácido fosfórico 85% (24:75:1 v/v/v).

A separação cromatográfica foi otimizada para eluição com gradiente utilizando-se fase móvel A, água:metanol: ácido fosfórico 85%: trietilamina (30:70:1:1,5; v/v/v/v) e fase móvel B (metanol), com a seguinte programação: concentração inicial da fase móvel B 20%, aumentando até 35% em 18 minutos.

Para quantificação dos alfa ácidos e beta ácidos utilizou-se uma solução de um padrão adquirido diretamente da ASBC identificado como ICE (International Calibration Extract), que é um padrão de referência que apresenta valores declarados de concentração destes compostos. A partir das massas do padrão e das amostras, das diluições utilizadas e da área dos picos, foram calculadas as concentrações dos constituintes das amostras, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Fator de resposta (RF)} = \frac{\text{massa do ICE (g)} \times \text{concentração do componente no ICE (\%)}}{\text{área do componente no ICE}}$$

$$\text{Componente (\%)} = \frac{\text{FD} \times \text{área do componente na amostra} \times \text{RF}}{\text{massa da amostra (g)}}$$

Sendo: FD – fator de diluição = 1 para extratos de lúpulo com massa inicial de 10 g e 0,1 para extratos de lúpulo com massa de 1 g.

ICE – padrão de referência fornecido pela ASBC (American Society of Brewing Chemists).

Resultados e discussão

Óleo essencial

Os rendimentos obtidos das destilações e a composição do óleo essencial de lúpulo são apresentados na Tabela 1.

Não foi observada diferença significativa no rendimento de óleo essencial para as diferentes massas de lúpulo variando de 10 g a 100 g ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu para os principais componentes do óleo essencial apresentados na Tabela 1. Assim, não houve alteração da composição do óleo reduzindo-se o peso de lúpulo ($p < 0,05$). Desse modo, para a destilação do óleo essencial sugere-se a redução de massa de lúpulo de 100 g para 10 g a 20 g. Na destilação de 100 g se utilizou 1,5 litros de água, que foi aquecida à ebulição, gerando uma carga térmica muito elevada, o que requer banhos de resfriamento de alto desempenho, não disponíveis em todos os laboratórios. Por outro lado, a destilação de 10 g a 20 g utilizou 150 mL de água, que corresponde a 10% do volume de água original, o que permite a utilização de água corrente para resfriar o condensador, quando banhos termostáticos não estão disponíveis. Este volume é igual para as massas menores porque isto depende do volume do balão utilizado.

Para a amostra analisada, o mircenol (~64%) seguido de β -cariofileno (~7,8%) e β -selineno (~4,2%) foram os principais constituintes, e estes resultados correspondem ao percentual destes componentes para o total de cerca de 30 substâncias identificadas. Comparando-se os resultados obtidos com lúpulos cultivados no Brasil, Marcondes et al. (2024), reportaram resultados para variedades cultivadas no Estado do Rio de Janeiro, com rendimento de óleo (base seca) de 4,1% para a variedade Comet e de 2,0% para a variedade Triumph. Os principais constituintes do óleo da variedade Comet foram mircenol (64,9%), β -cariofileno (8,3%), α -selineno (3,7%), β -selineno (3,5%) e (E)- β -ocimeno (1,8%), enquanto que para o óleo essencial da variedade Triumph, o α -humuleno foi o principal constituinte (41,7%), seguido por mircenol (28,5%), β -cariofileno (11,5%), δ -cadineno (2,1%) e epóxido de humuleno II (1,5%). Para as variedades Columbus, Chinook, Nugget, Cascade e Hallertau, cultivadas em Botucatu, estado de São Paulo, o rendimento de óleo essencial variou de 0,8 a 4,5 mL/100 g de lúpulo e os principais componentes foram o mircenol (14% a 58%), β -farneseno (17% a 38%) e ledeno (7% a 11%) (Fortuna et al., 2023). As variedades Cascade e Chinook, cultivadas na cidade de Ribeirão Preto,

Tabela 1. Rendimento de óleo essencial (%) e da composição do óleo* (mg/g) quanto à variação da quantidade de lúpulo

Parâmetros	Massa de lúpulo utilizado no método de extração do óleo essencial			
	10 gramas	15 gramas	20 gramas	100 gramas
Teor de óleo essencial (% peso óleo/peso lúpulo) base seca	4,75 ± 0,4 a	5,50 ± 0,5 a	5,75 ± 0,4 a	4,15 ± 0,1 a
Mirceno (mg/g)	400 ± 88 a	478 ± 73a	482 ± 21 a	550± 217 a
2-MBIB (mg/g)**	4,01 ± 1 a	4,1 ± 0,3 a	4,2 ± 0,3 a	5,4 ± 2 a
β-cariofileno (mg/g)	50,4 ± 7,7 a	55,9 ± 0,4 a	55,2 ± 5,7 a	70,2 ± 28,2 a
α-humuleno (mg/g)	5,2 ± 2,9 a	4,7 ± 1,6 a	5,9 ± 1,5 a	5,4 ± 3,0 a
β-selineno (mg/g)	32,3 ± 3,6 a	29,9 ± 2,1 a	29,5 ± 3,4 a	30,8 ± 11,1 a

Resultados de médias e desvio padrão de quatro repetições. Resultados seguidos de letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo Teste de Tukey

* Composição do óleo essencial expresso em mg componente/g do óleo essencial

**MBIB: isobutirato de 2-metil-butila.

apresentaram teor de óleo essencial de 0,39% a 1,43%, sendo que os principais componentes do óleo essencial foram o mirceno (29% a 70%), α-humuleno (18% a 29%) e β-cariofileno (5% a 12%), apresentando variação significativa em dois anos de análise (Souza et al., 2024).

Estes resultados indicam que há variabilidade entre variedades tanto nos teores quanto na composição do óleo e confirmam a importância da avaliação de qualidade do lúpulo.

Alfa ácidos e beta ácidos

Quanto aos teores de alfa e beta ácidos, os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Na análise por CLAE foram quantificados os alfa ácidos (co-humulona, n-humulona + ad-humulona) e os beta ácidos (co-lupulona e n-lupulona

+ ad-lupulona). Estes resultados foram obtidos na análise por CLAE utilizando-se gradiente de eluição, que permite a separação de todos estes compostos. No entanto, no certificado do ICE, não há resultado em separado para n-humulonas e ad-humulona, bem como para n-lupulona e ad-lupulona, apenas da soma, assim esses resultados foram apresentados como a soma.

Não houve diferença significativa para os componentes do extrato e a soma dos alfa ácidos e beta ácidos para as três condições de extração avaliadas, seja pela redução da quantidade de amostra ou quanto às diferenças de condições de agitação ou contato entre as fases ($p < 0.05$).

No método oficial utilizam-se 10 g de lúpulo por replicata e a quantidade inicial de solvente para

Tabela 2. Teores de alfa e beta ácidos quanto à variação da quantidade de lúpulo na extração e do tipo de contato

Compostos (g/100g)	Método de extração e condições de agitação		
	Método oficial 10 gramas agitador orbital	Método reduzido 1 grama agitador orbital	Método reduzido 1 grama vórtex + banho de ultrassom
co-humulona	7,78 ± 1,25 ^a	7,43 ± 0,96 ^a	7,53 ± 1,47 ^a
n-humulona + ad-humulona	10,01 ± 1,71 ^a	9,57 ± 1,32 ^a	9,71 ± 2,01 ^a
Soma de alfa ácidos	17,91 ± 2,99 ^a	17,11 ± 2,31 ^a	17,36 ± 3,52 ^a
co-lupulona	4,30 ± 0,74 ^a	4,12 ± 0,58 ^a	4,19 ± 0,86 ^a
n-lupulona + ad-lupulona	2,28 ± 0,43 ^a	2,18 ± 0,35 ^a	2,16 ± 0,47 ^a
Soma de beta ácidos	6,55 ± 1,20 ^a	6,28 ± 0,94 ^a	6,32 ± 1,32 ^a

Resultados expressos como média e desvio padrão de 12 replicatas.

Resultados seguidos com mesma letra na mesma linha não diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey

extração é de 120 mL, depois adiciona-se mais 40 mL de solução de HCl, o que requer o uso de uma vidraria de maior tamanho e que o frasco com amostra fique tampado, para evitar a evaporação do solvente. Neste estudo foi escolhido um frasco Erlenmeyer. O tipo de agitação não é mencionado no método da ASBC. Poderia-se utilizar agitação com barra magnética, mas seriam necessárias diversas placas de agitação para executar várias amostras ao mesmo tempo. Assim, para a quantidade de 10 g optou-se por banho de agitação orbital ou shaker, que permite a agitação de diversas amostras e replicatas ao mesmo tempo. Nesta quantidade de amostra, o volume total de solvente foi de 170 mL, e o volume de solvente para descarte é de aproximadamente 210 mL, por replicata.

Nos ensaios com massa de amostra de 1 g, foi possível utilizar tubos Falcon de 50 mL (conforme indicado na Figura 3) e volume total de solvente por replicata foi de 17 mL, com volume de descarte de 21 mL. Ou seja, houve uma redução de 90% do volume de solvente empregado. Isto significa menor custo com solventes e com o descarte, uma vez que não é possível nenhum tipo de recuperação da mistura de solventes ao final da análise.

A redução para 1 g, seja com agitação em agitador orbital ou em vórtex/banho de ultrassom, foi eficaz para a quantificação dos alfa ácidos e beta ácidos em relação ao método com 10 g, mas há diferença quanto ao tempo de análise. Na análise com agitador orbital, o tempo utilizado nas extrações foi de 50 minutos. No ensaio com agitação por vórtex/banho de ultrassom, o tempo foi menor que 9 minutos, o que representa, além do menor tempo, a possibilidade de executar maior número de amostras.

Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2021), em estudo inicial realizado pelo nosso grupo de pesquisa na redução de 10 g de lúpulo e agitador orbital para 1 g (vórtex/banho de ultrassom), sendo que os teores de alfa e beta ácidos foram de 1,54% e 1,52% e de 1,41% e 1,40%, respectivamente, sem diferença significativa entre os ensaios.

Quanto à análise cromatográfica, há uma sugestão no método oficial para análise isocrática com fase móvel composta por água:metanol:ácido fosfórico 85%, cujo cromatograma é apresentado na Figura 4. Nestas condições não ocorre separação completa dos alfa ácidos e beta ácidos.

Por outro lado, quando se usou gradiente com alteração da composição da fase móvel (Figura 5), foi possível separar todos os analitos de interesse, bem como reduzir o tempo da corrida cromatográfica. Estes resultados indicam que é possível otimizar

a separação cromatográfica, se houver interesse na obtenção das concentrações individuais de todos os alfa ácidos e beta ácidos.

Os resultados obtidos estão na faixa de valores observados para diferentes variedades de lúpulo e, em geral, os alfa ácidos apresentam resultados superiores aos beta ácidos.

A variabilidade nos teores de alfa ácidos e beta ácidos foi observada tanto para variedades quanto em relação a diferentes anos de cultivo. Em estudos realizados com variedades da República Tcheca, entre os anos 2005 e 2024, os teores de alfa e beta ácidos variaram de 1,9% a 8,7% e de 1,2% a 8,6% (Nesvadba et al., 2024). Para variedades de lúpulo consideradas amargas (bitter), Nesvadba et al. (2023) encontraram resultados de teores de alfa e beta ácidos variando de 8% a 16% e de 3,7% a 7,3%, respectivamente, sendo que para todas as variedades houve redução nestes teores ao longo de 13 anos de cultivo.

Existem poucos resultados de análise de alfa e beta ácidos de lúpulo do Brasil e para as variedades Columbus, Chinook, Nugget, Cascade e Hallertau, cultivadas em Botucatu, estado de São Paulo, o teor de alfa e beta ácidos variou de 0,43% a 4,31% e de 0,58% a 1,23%, respectivamente (Fortuna et al., 2023).

Estas alterações nos métodos oficiais atendem parcialmente às normas de validação de métodos de análise (INMETRO, 2020), já que ensaios interlaboratoriais, ensaios de proficiência e materiais certificados de referência não estão disponíveis para esta matriz. A comparação entre os métodos oficiais e os métodos propostos foi realizada e não houve diferença significativa entre os resultados obtidos. Quanto à repetitividade, o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo variou de 15% a 20%, que foi considerado aceitável devido à heterogeneidade dos cones. A seletividade dos métodos cromatográficos foi avaliada pela alteração da fase móvel na cromatografia líquida (para alfa e beta ácidos), atingindo resolução de 100% entre os analitos avaliados e pela análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para o óleo essencial.

Conclusões

Quanto ao método de destilação do óleo essencial de lúpulo, foi possível reduzir a quantidade de lúpulo de 100 gramas para 10 a 20 gramas, o que representa uma economia de matéria-prima de 80% a 90%, sem prejuízo para quantidade de óleo essencial recuperada, e sem alterações na composição do óleo essencial. Nestas condições propostas,

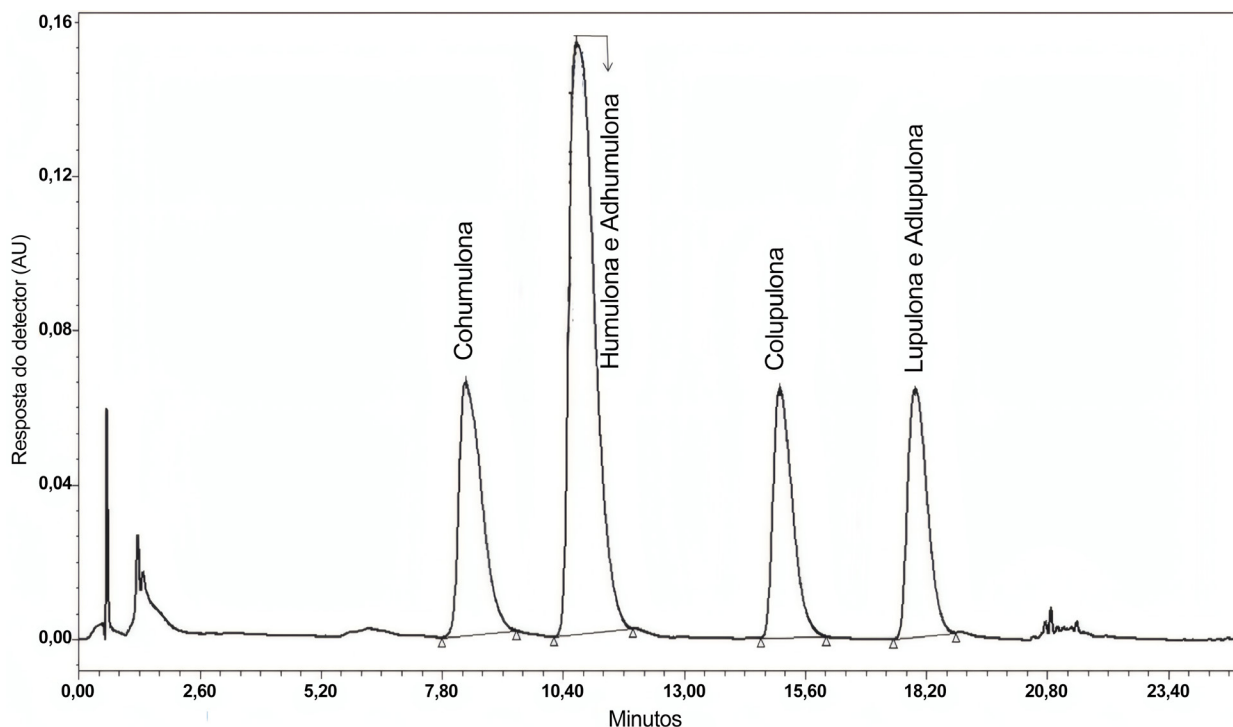


Figura 4 Cromatograma de separação dos alfa ácidos e beta ácidos do padrão ICE (*International Calibration Extract*) em corrida isocrática com fase móvel composta por água: metanol: H₃PO₄ (85%) (24:75:1, v/v/v).

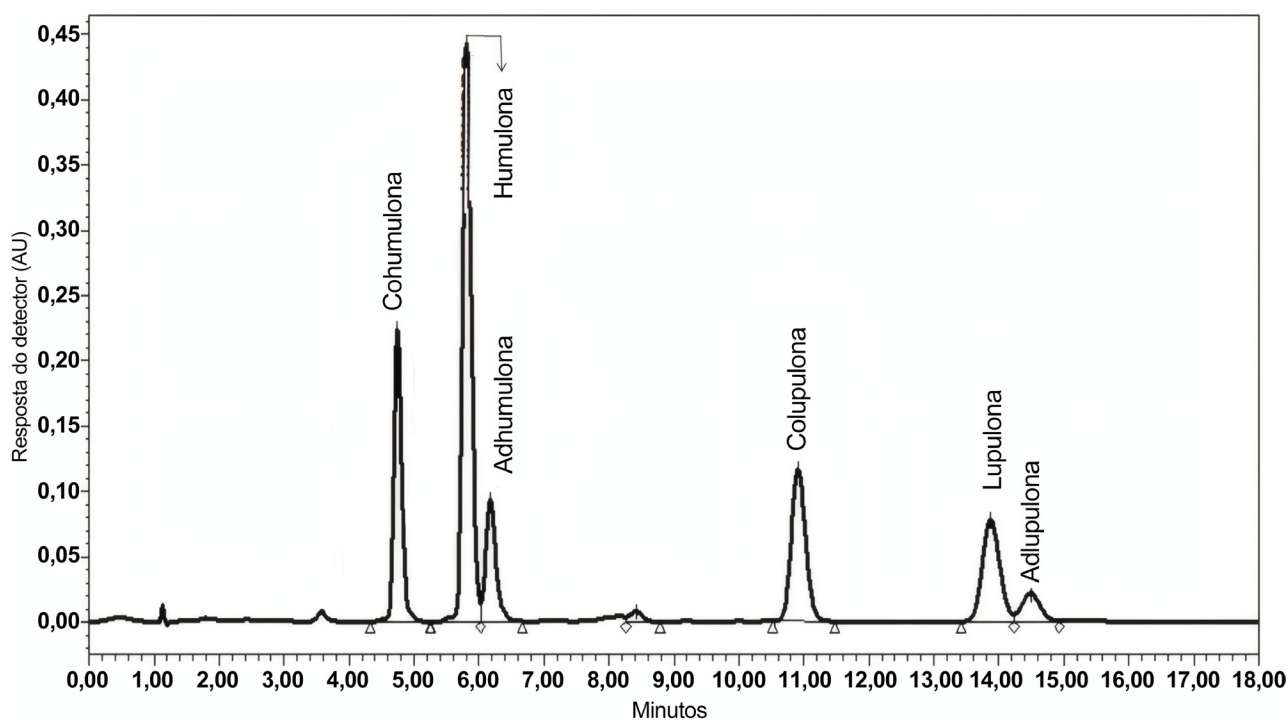


Figura 5. Cromatograma de separação dos alfa ácidos e beta ácidos do padrão ICE (*International Calibration Extract*) em análise por gradiente com fase móvel A composta por: água:metanol:ácido fosfórico 85%:triethylamina (30:70:1:1,5, v/v/v/v) e fase móvel B: metanol. Análise por gradiente com Fase móvel B variando de 20% a 35% de 0 a 18 minutos.

o volume de água necessária e o consumo de energia também são reduzidos.

Para o método de análise de alfa e beta ácidos, foi possível reduzir em 90% a quantidade de lúpulo necessário à realização dos ensaios de extração, sem diferenças nos teores destes compostos. Com a redução de 10 gramas para 1 grama de lúpulo, foi possível reduzir em 90% o volume de solvente utilizado e, conseqüentemente, o volume de descarte de resíduos de solventes. Além disso, o uso de agitação com vórtex/banho de ultrassom reduziu o tempo de extração de 50 minutos para menos de 10 minutos.

Quanto à análise dos alfa e beta ácidos por cromatografia líquida utilizando-se gradiente de eluição, foi possível atingir a separação completa entre os picos de humulona e ad-humulona, nos alfa ácidos, e lupulona e ad-lupulona, nos beta ácidos, o que não ocorre para as condições de eluição isocrática recomendadas no método oficial da ASBC.

As alterações propostas nestes métodos de avaliação da qualidade do lúpulo representam uma economia tanto para os produtores quanto para as cervejarias, já que se trata de uma matéria-prima de alto valor agregado.

Agradecimentos

A Marcelly C. S. Santos, pela realização de parte das análises e a Marcos Moulin e André Luís do Nascimento Gomes, pela edição das figuras e fotos.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Determinação de óleos voláteis. In: **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2019. p. 318-321.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. **α -Acids and β -acids in hops and hop extracts by HPLC (International Method)**. Saint Paul, MN: American Society of Brewing Chemists, 2011a, 2 p. DOI: <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Hops-14>.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. **Total essential oils in hops and hop pellets by steam distillation**. Saint Paul, MN: American Society of Brewing Chemists, 2011b, 2 p. DOI: <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Hops-13>.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. **Hop essential oils by capillary gas chromatography-flame ionization detection**. Saint Paul, MN: American Society of Brewing Chemists, 2011c, 2 p. DOI: <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Hops-17>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da União**: seção 1, ano 157, n. 239, p. 31, 11 dez. 2019.
- BIZZO, H. R.; BARBOZA, E. G.; SANTOS, M. C. S.; GAMA, P. E. A set of electronic sheets for the identification and quantification of constituents of essential oils. **Química Nova**, v. 43, p. 98-105, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170458>.
- CACHET, T.; BREVARD, H.; CHAINTREAU, A.; DEMYTTENAERE, J.; FRENCH, L.; GASSENMEIER, K.; JOULAIN, D.; KOENIG, T.; LEIJS, H.; LIDDLE, P.; LOESING, G.; MARCHANT, M.; MERLE, Ph.; SAITO, K.; SCHIPPA, C.; SEKIVA F.; SMITH, T. IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID. **Flavour & Fragrance Journal**, v. 31, p. 191-194, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.3311>.
- DURELLO, R.; SILVA, L. M.; BOGUS JUNIOR, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>.
- FORTUNA, G. C.; NEVES, C. S.; CAMPOS, O. P.; GOMES, J. A. O.; SILVA, J. C. R. L.; SOUZA, A. A.; FUNARI, C. S. D.; MARQUES, M. O. M.; BONFIM, F. P. G. Hop Tropicalization: Chemical Compositions of Varieties Grown under Organic and Conventional Systems in Subtropical Conditions. **Horticulturae**, v. 9, p. 855, 2023. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080855>
- INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. Revisão 09, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/cdtn/pt-br/centrais-de-conteudo/documentos-cgcre-abnt-nbr-iso-iec-17025/doq-cgcre-008/view>. Acesso em: 5 jan. 2026.
- MARCONDES, A. M.; GAMA, P. E.; ANTONIASSI, R.; FONSECA, M. J. de O.; BIZZO, H. R. Quality of the essential oil from two hop varieties introduced in Rio de Janeiro, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 54., 2024. Balatonalmádi. Book of abstracts. ISEO. 8 a 11 set. Ref. P-17. Poster abstracts.
- NESVADBA, V.; OLŠOVSKÁ, J.; CHARVÁTOVÁ, J.; TRNKOVÁ, S.; FRITSCHOVÁ, G. New Czech fine aroma hop varieties (*Humulus lupulus* L.)—Saaz Brilliant, Saaz Comfort and Saaz Shine—have found extensive use in hop growing and beer brewing. **Brewing Science**, v. 77, p. 142-149, 2024. DOI: <https://doi.org/10.23763/BRSC24-11>.

NESVADBA, V.; STRAKOVÁ, L.; FRITSCHOVÁ, G.; OLŠOVSKÁ, J.; CHARVÁTOVÁ, J.; TRNKOVÁ, S. Evaluation of variability of the content of alpha and beta acids in Czech bittering hop varieties (*Humulus lupulus* L.). **Kvasny prumysl**, v. 69, p. 719-725, 2023.

SOUZA, M. de L. M. de; ANTONIASSI, R.; BIZZO, H. R.; NOGUEIRA, R. I.; CORNEJO, F. E. P.; FONSECA, M. J. de O. **Avaliação do ponto de colheita e tempo de secagem do lúpulo com relação ao teor de alfa e beta-ácidos**. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PESQUISADORES E PRODUTORES DE LÚPULO, 2., 2021, Online. 7 p. Organizado por: Grupo de Pesquisa LUPAM - Lúpulo: Pesquisa, Aplicações e Manejo da

Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu (SP).

SOUZA, B. C. D., CONTIN, D. R., VIEIRA, P. C.; COSTA, F. B. D. Análise de óleos voláteis de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) Cascade e Chinook cultivados sob clima tropical no estado de São Paulo. **Química Nova**, v. 47, n. 3, e-20230109, 2024.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography.

Journal of Chromatography, v. 11, p. 463-471, 1963.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).



Ministério da
Agricultura e Pecuária