

II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
 26 e 27 de Novembro de 2021

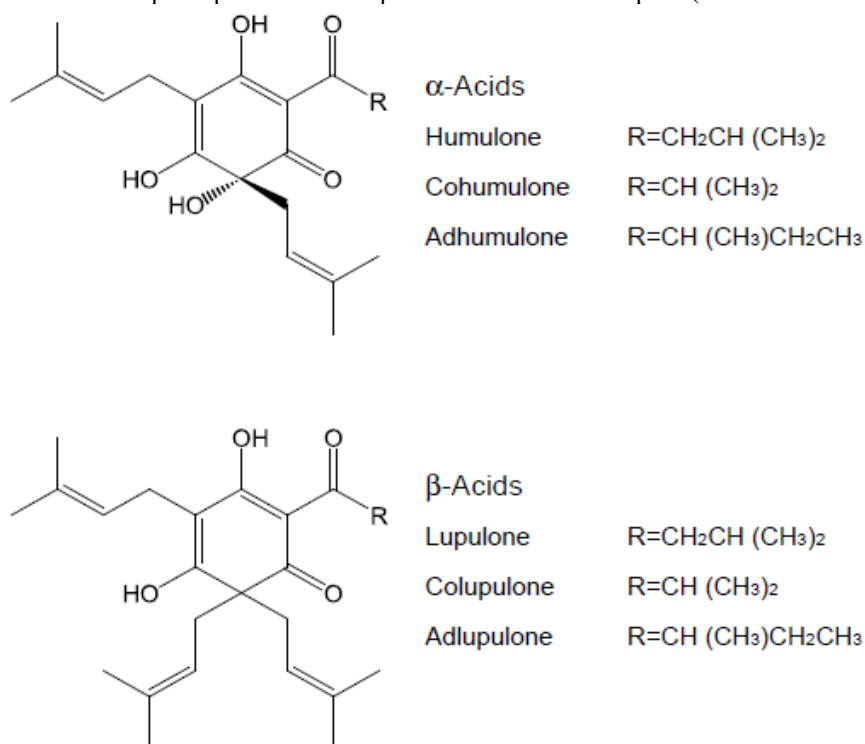
VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE ALFA E BETA-ÁCIDOS EM LÚPULO UTILIZANDO MENOR QUANTIDADE DE AMOSTRA.

Maria de Lourdes Mendes de Souza, Monalisa Santana Coelho de Jesus, Rosemar Antoniassi
 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ, Brasil,
 e-mail:marialourdes.m.souza@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é um dos ingredientes básicos na fabricação da cerveja, pois confere amargura e aroma característicos ao produto final. As inflorescências femininas do lúpulo acumulam óleos essenciais, prenilflavonóides e ácidos amargos. Os α -ácidos e β -ácidos são os principais componentes do lúpulo que contribuem para o gosto amargo da bebida e suas estruturas químicas são apresentadas na Fig. 1. Ambos os grupos compreendem três principais congêneres [normais- (n-), co- e ad-homólogos], que diferem em suas cadeias laterais acila [α -ácidos, co-humulona, n-humulona e ad-humulona; β -ácidos, co-lupulona, n-lupulona e ad-lupulona] (DURELLO, 2019).

Figura 1. Estrutura dos principais α -ácidos e β -ácidos extraídos do lúpulo (Fonte: Shimadzu, L389).



II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
26 e 27 de Novembro de 2021

A análise dos alfa e beta-ácidos é fundamental para avaliar a qualidade do lúpulo e seu valor de mercado. O método oficial de análise da American Society of Brewing Chemists (HOPS – 14) utiliza 10 g de amostra para esta determinação. Com o objetivo de otimizar o método e reduzir a quantidade de amostra, validamos no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos um método utilizando apenas 1 g de amostra e comparamos como método oficial. Além disso, também foi comparada a extração por agitação orbital (*em Shaker*) e por ultrassom. Este método utiliza cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa (CLAE) com detecção ultravioleta para separar e quantificar co-humulona, n- + ad-humulona, co-lupulona e n- + ad-lupulona em lúpulo e extrato de lúpulo (SHIMADZU, L389).

2. MATERIAL E MÉTODOS

As flores de lúpulo foram cedidas por Paulo e Moema Cordeiro colhidos em 2019 e 2020 da plantação em Nova Friburgo/RJ.

A amostra de referência utilizado para os cálculos das concentrações de co-humulona, n- + ad-humulona, co-lupulona e n- + ad-lupulona foi o Extrato de Calibração Internacional (*International Calibration Extract 4 - IEC-4*) adquirida na Sociedade Americana de Fabricantes de Cerveja (*American Society of Brewing Chemists*).

Inicialmente, a separação cromatográfica foi otimizada com o Extrato de Calibração Internacional (IEC-4) introduzindo trietilamina (TEA) na fase móvel (SHIMADZU, L389). Foi utilizada uma coluna Thermo BDS Hipersil C18, medindo 10 x 4,6 mm com partículas de 2,4 µm, detector DAD nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel A (água / metanol / ácido fosfórico (85%) / trietilamina - 300 mL / 700 mL / 10 mL / 15 mL) e fase móvel B (Metanol) com a seguinte programação, B Conc. 20% (0 min) até 35% (18 min); fluxo de 1 mL / min., temperatura da coluna de 40 ° C e volume de injeção de 10 µL.

Inicialmente foi comparado Método Oficial (MO) de extração da American Society of Brewing Chemists, (Hops 14), utilizando 10 g de amostra, com o Método Reduzido (MR) pesando-se apenas 1 g de amostra. A extração seguiu o mesmo

*II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
26 e 27 de Novembro de 2021*

procedimento, ambos em 30 min de extração em agitador orbital, porém os solventes foram reduzidos na mesma proporção.

Posteriormente, um novo método de extração também foi avaliado utilizando-se apenas 1 g de amostra, comparando-se a agitação mecânica com o vortex e ultrassom e reduzindo-se também o tempo de extração de 30 para 5 min.

Extração dos ácidos amargos do Lúpulo

Pesagem da amostra finamente triturada (10 g e 1 g), adição de metanol (20 mL e 2 mL) e éter dietílico (100 mL e 10 mL) seguido de agitação mecânica durante 30 min. (ou 1 min. em vortex e 5 min. em ultrassom) mantendo o frasco bem tampado. Adição de solução de ácido clorídrico 0,1 M (40 mL e 4 mL) e agitação por mais 10 min (ou 1 min. em vortex e 1 min. em ultrassom). Após repouso por 10 min. para separação das fases, o sobrenadante (5 mL e 0,5 mL) foi transferido para um balão volumétrico (50 mL e 5 mL) e o volume foi completado com metanol. O extrato foi homogeneizado, centrifugado e colocado em um vial para injeção no cromatógrafo. Dez microlitros do extrato foram injetados no cromatógrafo nas condições descritas acima.

O Extrato de Calibração Internacional (IEC-4) foi diluído em quadruplicata e injetado. Quatro fatores de resposta individuais foram calculados para a co-humulona, n- + ad-humulona, co-lupulona e n- + ad-lupulona. A média dos quatro fatores de resposta foi utilizada para os calculados das concentrações dos α e β -ácidos.

Cálculo dos Resultados

Fator de Resposta (FR)

$$FR = \frac{\text{massa extr. calib. (g)} * \text{conc. componente ext. cal. (\%)}}{\text{área da componente da calib.}}$$

Componente (%)

$$(\%) = \frac{FD * \text{média da área do pico do componente} * FR}{\text{massa da amostra (g)}}$$

Onde FD = Fator de Diluição, e FD = 1 para extratos de lúpulo do MO, FD = 0,1 para extratos de lúpulo do MR.

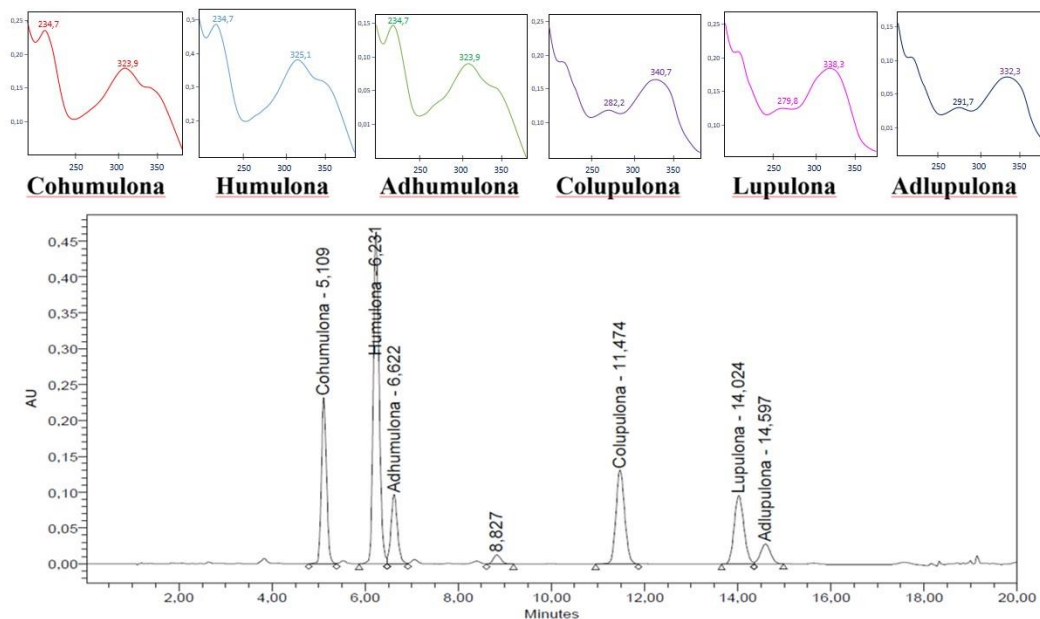
II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
26 e 27 de Novembro de 2021

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na otimização do método foi obtida uma resolução cromatográfica superior à do método oficial, onde pode-se observar seis sinais principais, um pico para cada ácido, assim como, as separações de humulona e ad-humulona, e do lupuleno e ad-lupuleno. Além disso, o tempo de corrida foi reduzido de 30 para 18 minutos.

A Fig. 2 mostra o cromatograma do Extrato de Calibração Internacional (ICE-4) e separação dos principais α - e β -ácidos e seus respectivos espectros de UV, o tempo de corrida é de 18 minutos.

Figura 2. Cromatograma do ICE-4 e separação dos principais α - e β -ácidos e seus respectivos espectros de UV. FM A: H₂O: MeOH: H₃PO₄ 85%: TEA (300:700:10:15; v/v/v/v); FM B: MeOH. Gradiente : B Conc. 20% (0 min) → 35% (18 min) (Fonte: Próprio autor, 2021).



Como pode ser observado na Tab. 1, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as análises realizadas com o Método Oficial (10 g de amostra) ou Método Reduzido (1 g) de amostra.

Comparou-se também, utilizando-se 1 g de amostra, os métodos de extração utilizando agitação orbital em *Shaker* por 30 min e ultrassom por 5 min. Não houve diferença entre os métodos quanto a variância (Teste F). Houve diferença significativa entre os métodos para todos os fatores de resposta ($p < 0,05$). Os resultados de ultrassom

II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
 26 e 27 de Novembro de 2021

foram significativamente maiores que agitação orbital, mesmo com menor tempo de extração (Tab. 2).

Tabela 1: Comparação das concentrações de co-humulona, n- + ad-humulona, co-lupulona e n- + ad-lupulona obtidas nos dois métodos de extração: Método Oficial (10 gramas de amostra) pelo Método Reduzido (1 grama).

Alfa e beta ácidos/Soma	Método oficial (10 gramas)			Método reduzido (1 grama)		
	Média	DP	CV (%)	média	DP	CV (%)
Cohumulona (%)	0,34 ^a	0,02	6,4	0,31 ^a	0,04	11,7
n+Adhumulona (%)	1,21 ^a	0,07	5,6	1,11 ^a	0,12	11,2
Total de Alfa-ácidos (%)	1,54 ^a	0,09	5,8	1,41 ^a	0,16	11,3
Colupulona (%)	0,86 ^a	0,04	4,7	0,79 ^a	0,09	11,2
n+Adlupulona (%)	0,67 ^a	0,02	2,8	0,62 ^a	0,06	9,5
Total de Beta-ácidos (%)	1,52 ^a	0,06	3,8	1,40 ^a	0,15	10,3

Média de cinco repetições

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

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

Tabela 2: Comparação das concentrações de co-humulona, n- + ad-humulona, co-lupulona e n- + ad-lupulona obtidas nos dois métodos de extração: utilizando agitação orbital em *shaker* por 30 min e ultrassom por 5 min.

Alfa e beta ácidos/soma	Ultrassom			Agitação orbital		
	média	DP	CV(%)	média	DP	CV(%)
Cohumulona (%)	1,01 ^a	0,05	4,8	0,88 ^b	0,06	6,5
n+Adhumulona (%)	2,74 ^a	0,14	5,1	2,38 ^b	0,16	6,6
Total de Alfa-ácidos (%)	3,75 ^a	0,19	5,1	3,26 ^b	0,21	6,6
Colupulona (%)	0,76 ^a	0,04	5,6	0,66 ^b	0,04	6,4
n+Adlupulona (%)	0,73 ^a	0,04	6,0	0,64 ^b	0,04	6,6
Total de Beta-ácidos (%)	1,49 ^a	0,09	5,7	1,30 ^b	0,08	6,5

Média de cinco repetições

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

DP – desvio padrão

CV – coeficiente de variação

*II ENBRALÚPULO - Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo (Online)
26 e 27 de Novembro de 2021*

4. CONCLUSÕES

A otimização e validação do método analítico para análise cromatográfica de alfa e beta-ácidos em lúpulo proposta nesse trabalho alcançou vantagens em relação ao método oficial, com redução de insumos em 90% tanto de amostra e solventes, quanto de resíduos gerados e também de 40% do tempo de análise, além da separação completa de todos os analitos, que a partir dela poderão ser quantificados separadamente.

REFERÊNCIAS

American Society of Brewing Chemists, Hops 14. α -Acids and β -Acids in Hops and Hop Extracts by HPLC, 2010, doi: 10.1094/ASBCMOA Hops - 14.

Durello, R. S.; Silva, L. M. e Bogusz Jr., S. Química do Lúpulo. *Quim. Nova*, Vol. 42, No. 8, 900-919, 2019

Shimadzu Application News High Performance Liquid Chromatography no. L389 High Speed with High Resolution Analysis (Part 28) Analysis of α -Acids and β -Acids in Hops.

Agradecimentos

Agradecimentos a Paulo e Moema Cordeiro que cederam o lúpulo para as análises.