



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ALINE DA ROSA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DO LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) CULTIVADO NO BRASIL,
OBTENÇÃO DOS SEUS EXTRATOS E APLICAÇÃO EM FILMES POLIMÉRICOS**

Florianópolis

2019

ALINE DA ROSA ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DO LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) CULTIVADO NO BRASIL,
OBTENÇÃO DOS SEUS EXTRATOS E APLICAÇÃO EM FILMES POLIMÉRICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Aline da Rosa

CARACTERIZAÇÃO DO LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) CULTIVADO NO BRASIL, OBTENÇÃO DOS SEUS EXTRATOS E APLICAÇÃO EM FILMES POLIMÉRICOS / Aline da Rosa Almeida; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto, 2019.

154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Compostos bioativos. 3. Lúpulo brasileiro. 4. Embalagens ativas. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Aline da Rosa Almeida

CARACTERIZAÇÃO DO LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) CULTIVADO NO BRASIL, OBTENÇÃO DOS SEUS EXTRATOS E APLICAÇÃO EM FILMES POLIMÉRICOS

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rafael Dutra de Armas
Centro Universitário Católica /SC

Profª. Dra. Itaciara Larroza Nunes
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos.

Profª. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
Orientador

Florianópolis, 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu marido Matheus Maciel por toda paciência, amor, companheirismo, amizade, dedicação e parceria.

A toda minha querida família, avós, tias, tios, primos e em especial aos meus pais Vera Lucia de Almeida e Neivaldo Estevam de Almeida e a minha irmã preferida Andressa da Rosa Almeida por todo incentivo. Aos meus sogros Maria Odete e Elio Maciel pelo apoio e incentivo.

Ao professor Pedro Luiz Manique Barreto, por todos os ensinamentos e confiança durante esses anos.

A professora Jane Mara Block, por todos os ensinamentos, colaboração e disponibilidade de seu laboratório para a realização de algumas análises desse trabalho.

A amiga querida Michelle Heck Machado pela amizade, aprendizado e incentivo.

Aos amigos e colegas de laboratório de Reologia e Polímeros Naturais: Bianca, Giovana, Daniele, Carolina, Bruna, Ana Paula Zapelini, Ana Paula de Melo e Tiago. Aos amigos Fernanda, Kelly, Rafael, Cleonice, Michael, Gerson e Larissa. Vocês foram muito importante para a realização deste trabalho por toda a amizade, ensinamentos e colaboração.

Ao centro de microscopia da UFSC, Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC), Laboratório de Controle de Qualidade de Farmácia da UFSC e Estação Experimental de Itajaí/SC/Epagri pelo aporte.

Aos membros da banca pela disposição.

A todos os professores e funcionários do PGCAL.

A UFSC, CNPQ, Capes e FAPESC.

A todos muito Obrigada.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os compostos bioativos do lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) cultivado pela primeira vez em grande escala e sem técnicas artificiais no Brasil (LB), comparando-o com a mesma variedade proveniente dos Estados Unidos (LU) e aplicar os extratos em filmes poliméricos ativos. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para determinar os melhores parâmetros de extração para os compostos fenólicos totais (CFT) para o LB e posteriormente as melhores condições foram aplicadas para a extração de LU. Comparativamente, o LB apresentou maior teor de CFT, flavonoides totais e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante que o LU. Flavonoides como isoquercetina (97,17 a 10,28 mg 100 mL⁻¹) e quercetina (16,56 a 2,38 mg 100 mL⁻¹) foram os compostos identificados em maior quantidade nos extratos de lúpulo LB e LU (seco e líquido). Os extratos de lúpulo apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) contra microrganismos como *Staphylococcus aureus* (100 µL mL⁻¹), *Bacillus cereus* (100 µL mL⁻¹) e *Proteus mirabilis* (300 µL mL⁻¹). A composição físico-química (umidade, cinzas, proteína, lipídeos, fibras brutas e carboidratos) dos cones de lúpulo LB e LU apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os parâmetros avaliados. Os principais compostos do óleo essencial dos lúpulos brasileiro (OLB) e dos EUA (OLU) foram *trans*- β -farneceno, β -selineno, mirceno, α -selineno, α -humuleno e β -cariofileno. Os compostos fenólicos predominantes nos cones dos lúpulos foram ácido protocatecuico, isoquercetina e ácido ferúlico. O extrato de lúpulo brasileiro (ELB) e o OLB apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados com o extrato de lúpulo dos EUA (ELU) e o OLU. Além disso os extratos apresentaram maior potencial antioxidante, que os óleos essenciais em ambas as amostras. Filmes foram preparados com diferentes proporções de polímeros a partir de quatro formulações diferentes, nos quais foram adicionados 10, 20 e 40 % dos extratos LB e LU. A formulação F2 contendo 70% quitosana, 30% poli(álcool vinílico) e 10% sorbitol apresentou melhores propriedades mecânicas, de cor, e menor ângulo de contato com a água, além de apresentar propriedade térmicas, reológicas, morfológicas e de espessura que confirmam a obtenção de filmes poliméricos finos. A atividade antioxidante dos filmes contendo extrato de LU foi maior em comparação com os filmes contendo extrato de LB. De acordo com os resultados sugere-se que os filmes podem ser eficazes na prevenção à oxidação em alimentos, por apresentar um atividade antioxidante.

Palavras-chave: Compostos bioativos; Lúpulo brasileiro; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana; Embalagens ativas.

ABSTRACT

This study work aimed to characterize the bioactive compounds of hops (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) grown for the first time on a large scale and without artificial techniques in Brazil (BH), comparing it with the same variety from the United States (UH) and apply the plant extracts to active polymer films. A central composite rotational design (CCRD) was used to optimise the extraction parameters for the yield of total phenolic compounds (TPC) for BH while the best conditions were applied for the extraction of UH. BH presented higher TPC content, total flavonoids and, consequently, higher antioxidant activity than UH. Flavonoids such as isoquercetin (97.17 to 10.28 mg 100 mL⁻¹) and quercetin (16.56 to 2.38 mg 100 mL⁻¹) were the compounds identified in greater quantity in hop extracts (dry and liquid). Hop extracts were effective against microorganisms such as *Staphylococcus aureus* (100 µL mL⁻¹), *Bacillus cereus* (100 µL mL⁻¹) and *Proteus mirabilis* (300 µL mL⁻¹). The physicochemical composition (moisture, ash, protein, lipids, crude fibers and carbohydrates) of hops cones (BH and UH) presented a significant difference ($p < 0.05$) in all evaluated parameters. The main compounds of Brazilian hop (BHO) and USA hop (UHO) essential oils were trans- β -farnecene, β -selinene, mirceno, α -selinene, α -humulene and β -cariofileno. The predominant phenolic compounds in hop cones were protocatecuic acid, isoquercetin and ferulic acid. Brazilian hop extract (BHE) and BHO showed higher antioxidant activity when compared to USA hop extract (UHO) and UHO. In addition, extracts presented higher antioxidant potential. Twelve films were prepared with different proportions of polymers from four different formulations in which 10, 20 and 40% of the BH and UH extracts were added. The F2 formulation containing 70% chitosan, 30% polyvinyl alcohol and 10% sorbitol showed better mechanical properties, color and lower contact angle with water, besides having thermal, rheological, morphological and thickness properties that confirm the production of thin polymer films. The antioxidant activity of the films containing UH extract was higher in comparison to the films containing BH extract. According to the results it is suggested that the films may be effective in preventing oxidation in foods, as they have an antioxidant activity.

Keywords: Bioactive compounds; Brazilian hops; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Active packaging.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

- Figura 1 Mapa da produção mundial de lúpulo em 2010 23
- Figura 2 Classificação do lúpulo 24
- Figura 3 Estrutura dos cones de lúpulo. A) Identificação da estrutura do cone de lúpulo; B) Glândulas de lupulina 24
- Figura 4 Estruturas de prenilflavonóides identificados em amostras de lúpulo 25
- Figura 5 Esquema do sistema de banho de ultrassom indireto 29
- Figura 6 Diagrama esquemático mostrando o conceito de embalagem ativa 32
- Figura 7 A - Estruturas químicas da quitina e quitosana; B - Estrutura dos monômeros D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina 34
- Figura 8 Estrutura química do poli(álcool vinílico) (PVA) 35

CAPÍTULO 2: Compostos bioativos e atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* do extrato do lúpulo brasileiro (*Humulus lupulus* L.)

- Figura 1 Gráfico de Pareto para a extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB) - DCCR ($R^2= 0,92841$). 63
- Figura 2 a - Superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de etanol (%) e temperatura de extração (°C) sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A proporção de sólido/ líquido de extração é constante ao nível zero, 1 g/ 25 mL; 65
- b - Superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de etanol (%) e proporção de sólido/líquido sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A temperatura de extração (°C) é constante ao nível zero, 50 °C;
- c - Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura de extração (°C) em relação a proporção de sólido/líquido sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A concentração de etanol (%) é constante ao nível zero, 60 %
- Figura 3 Espectros FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) dos extratos de lúpulo brasileiro (LB) e dos EUA (LU) 69

CAPÍTULO 3: Caracterização sistemática do lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) produzido no Brasil usando GC / MS e LC-ESI-MS / MS

Figura 1 A – Amostra de lúpulo brasileiro (LB). B – Amostra de lúpulo e dos EUA (LU) da variedade Cascade utilizado no presente trabalho 98

CAPÍTULO 4: Aplicação do extrato de lúpulo brasileiro (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) em filmes poliméricos

Figura 1 Curvas termogravimétricas dos filmes poliméricos de QTS, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA) 141

Figura 2 Curvas termogravimétricas dos polímeros quitosana, PVA e sorbitol utilizados na obtenção dos filmes poliméricos 142

Figura 3 Curvas de DSC dos polímeros quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol (SBT) utilizados na obtenção. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA) 143

Figura 4 Curvas de DSC dos filmes contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos LB (extrato de lúpulo brasileiro) 143

Figura 5 Curvas de DSC dos filmes contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos LU (extrato de lúpulo proveniente dos EUA) 144

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

CAPÍTULO 2: Compostos bioativos e atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* do extrato do lúpulo brasileiro (*Humulus lupulus* L.)

Tabela 1	Variáveis e níveis empregados no Delineamento Composto Central Rotacional para otimização da extração dos compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB) (<i>Humulus lupulus</i> L.) da variedade Cascade	54
Tabela 2	Delineamento composto central rotacional de cinco-nível, três-variável e uma resposta (Compostos fenólicos totais)	62
Tabela 3	Coefficientes de regressão do modelo polinomial para a extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB) ^a	64
Tabela 4	Valores ótimos para as três variáveis testadas no delineamento composto central rotacional.	67
Tabela 5	Análise de compostos bioativos. Letras diferentes na mesma linha indicam que existe diferença significativa ao nível de confiança de 95 %	68
Tabela 6	Perfil fenólico de extratos líquidos e secos de lúpulo da variedade Cascade produzidos no Brasil (LBL / LBS) e nos EUA (LUL / LUS) da forma líquida e seca respectivamente	72

CAPÍTULO 3: Caracterização sistemática do lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) produzido no Brasil usando GC / MS e LC-ESI-MS / MS

Tabela 1	Composição físico-química de lúpulo (LB e LU), em base seca	97
Tabela 2	Caracterização química de óleos essenciais de lúpulo brasileiro (OLB) e produzido nos EUA (OLU)	99
Tabela 3	Atividade antioxidante dos extratos de lúpulo em comparação com o óleo essencial de lúpulo	102
Tabela 4	Perfil fenólico dos lúpulo da variedade Cascade produzidos no Brasil (LB) e nos EUA (LU)	103

CAPÍTULO 4: Aplicação do extrato de lúpulo brasileiro (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade em filmes poliméricos

Tabela 2	Formulações obtidas para os filmes poliméricos	117
----------	--	-----

Tabela 2	Parâmetros L^* , a^* e b^* , coordenadas polares (C^* e H°) e variação total da cor (ΔE) dos filmes com diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA).	125
Tabela 3	Imagem das formações de filmes poliméricos. Com diferentes concentrações de LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA).	127
Tabela 4	Ângulo de contato, energia livre superficial total, componente dispersivo e componente polar dos filmes em contato com a água, formamida e diiodometano. Onde C (controle), LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	129
Tabela 5	Propriedades mecânicas dos filmes de QTS, PVA e Sorbitol contendo extratos de lúpulo em diferentes concentrações. Onde C (controle), LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	133
Tabela 6	Espessura dos filmes de quitosana, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	135
Tabela 7	Micrografias da superfície dos filmes e seção transversal no aumento de 1000x	136
Tabela 8	Comportamento reológico das soluções formadoras de filmes de QTS, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	139
Tabela 9	Taxas de variação de massa dos filmes poliméricos de quitosana, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos de acordo com a temperatura. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	141
Tabela 10	Dados obtidos a partir dos termogramas para a estabilidade dos filmes de quitosana, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)	145
Tabela 11	Atividade antioxidante dos filmes contendo extratos de lúpulo LB e LU	145

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrometros
6-GN	6-geranilnaringenin
6-PN	6-prenilnaringenin
8-PN	8-prenilnaringenin
a.C.	Antes de Cristo
AA%	Porcentagem de atividade antioxidante
Abs	Absorbância da amostra resposta
ABTS ^{•+}	Ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
A _{max}	Absorbância máxima
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Au	Ouro
CFT	Compostos fenólicos totais
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
d.C.	Depois de Cristo
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DMX	Desmethylxantumol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EAS	Extração acelerada de solvente
EAU	Extração assistida por ultrassom
EC50%	Concentração efetiva para inibir 50% do radical livre
EFS	Extração por fluido supercrítico
ESL	Extração sólido-líquido convencional
FB	Fibras bruta
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>

FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GRAS	<i>Generally recognized as Safe</i>
HPLC-ESI-MS/MS	<i>High-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry</i>
IXN	Isoxantumol
kDa	Quilo Dalton
kgf	Quilo grama força
LB	Lúpulo brasileiro
LU	Lúpulo proveniente dos Estados Unidos
m	Massa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligramma
MH	Meio de cultura Mueller Hinton
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
nm	Nanômetro
OH	Hidroscila
PPO	Poli (óxido de propileno)
PVA	Poli (Álcool polivinílico)
QE	Equivalente de quercetina
R ²	Coeficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
RSM	Metodologia de superfície de resposta
TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
XN	Xantumol

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica	20
1. Lúpulo	21
2. Extração de compostos fenólicos por ultrassom.....	26
3. Embalagens para alimentos.....	29
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2: Compostos bioativos, atividades antioxidante e antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato do lúpulo brasileiro e dos EUA (<i>Humulus lupulus</i> L. var. Cascade)	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. Introdução	49
2. Material e métodos.....	51
2.1 Material.....	51
2.2 Planejamento experimental da extração.....	51
2.3 Extração assistida por ultrassom dos compostos fenólicos.....	53
2.4 Determinação de compostos fenólicos totais (CFT)	53
2.5 Determinação de teor flavonoides totais (TFT)	53
2.6 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier	54
2.7 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos extratos de lúpulo por LC-ESI-MS/M54	54
2.8 Atividade antioxidante	56
2.8.1 Ensaios de inibição do radical DPPH•.....	56
2.8.2 Ensaio de inibição do radical ABTS• ⁺	56
2.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínimados extratos de Lúpulo.....	57
2.10 Análises estatísticas	58
3. Resultados e discussão	59
3.1 Planejamento experimental da extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro.....	59
3.2 Compostos bioativos.....	65
3.3 Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier.....	67
3.4 Identificação e quantificação de compostos fenólicos do lúpulo por LC/ESI MS/MS.....	68
3.5 Atividade antioxidante (DPPH• e ABTS• ⁺).....	72

3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de Lúpulo.....	73
4. Conclusão.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 3: Caracterização do lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L. var. Cascade) produzido no Brasil e nos EUA usando GC / MS e LC-ESI-MS / MS.....	82
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
1. Introdução.....	85
2. Material e métodos.....	87
2.1 Material.....	87
2.2 Caracterização físico-química dos lúpulos.....	87
2.2.1 Teor de umidade.....	87
2.2.2 Cinzas totais.....	88
2.2.3 Lipídeos totais.....	88
2.2.4 Proteínas totais.....	88
2.2.5 Fibra bruta.....	89
2.2.6 Carboidratos.....	90
2.3 Extração por ultrassom dos compostos bioativos de lúpulo.....	90
2.4 Hidrodestilação dos óleos essenciais.....	90
2.5 Caracterização dos óleos essenciais.....	91
2.6 Ensaio de atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos extratos de lúpulo.....	91
2.6.1 Ensaio de inibição de radicais DPPH•.....	92
2.6.2 Ensaio de inibição de radicais ABTS*+.....	92
2.7 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos do lúpulo por HPLC-ESI-MS/MS.....	92
2.8 Análises estatísticas.....	94
3. Resultados e discussão.....	95
3.1 Caracterização físico-química.....	95
3.2 Caracterização dos óleos essenciais.....	97
Bergamotina.....	98
3.3 Ensaio de atividade antioxidante.....	100
3.4 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos dos lúpulos.....	101
4. Conclusão.....	105
REFERÊNCIAS.....	106
CAPÍTULO 4: Aplicação dos extratos de lúpulo brasileiro e dos EUA (<i>Humulus lupulus</i> L. var. Cascade) em filmes poliméricos.....	109
RESUMO.....	110

ABSTRACT.....	111
1. Introdução	112
2. Material e métodos.....	114
2.1 Material.....	114
2.2 Preparo dos extratos de lúpulo.....	114
2.3 Preparação dos filmes.....	115
2.4 Determinação da cor.....	115
2.5 Determinação do ângulo de contato e energia livre superficial.....	116
2.6 Medidas de espessura dos filmes.....	117
2.7 Propriedades mecânicas.....	117
2.8 Morfologia dos filmes.....	118
2.9 Determinação do comportamento reológico das soluções filmogênicas.....	118
2.10 Análise termogravimétrica (TGA).....	119
2.11 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	119
2.12 Atividade antioxidante (AA).....	119
2.13 Análises estatísticas.....	119
3. Resultados e discussão.....	121
3.1 Determinação da cor dos filmes.....	121
3.2 Ângulo de contato e energia livre superficial.....	126
3.3 Propriedades mecânicas e espessura dos filmes.....	129
3.4 Morfologia dos filmes contendo extratos de lúpulo LB e LU por MEV.....	133
3.5 Comportamento reológico das soluções filmogênicas.....	137
3.6 Análises térmicas dos filmes.....	138
3.7 Atividade antioxidante (AA) dos filmes contendo extratos de lúpulo (LB e LU).....	143
REFERÊNCIAS.....	146
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	152
Anexo.....	153

1. INTRODUÇÃO

O lúpulo é mundialmente conhecido e empregado na produção de cerveja e é responsável pelo aroma e amargor deste produto. A espécie *Humulus lupulus* L., é uma planta dioica, porém apenas as plantas fêmeas possuem flores em forma de cones, dentro das quais se desenvolvem as importantes "glândulas de lupulina". As características climáticas ideais para o seu cultivo são o clima frio do hemisfério norte, sendo que a sua maior produção ocorre na Alemanha e nos Estados Unidos. O lúpulo tem uma adaptação difícil ao clima brasileiro, por isso até então não existiam relatos de produção deste no Brasil e todo o lúpulo aqui usado era importado de países produtores. Porém, em abril de 2016, foi realizada a primeira colheita do lúpulo cultivado no Brasil (São Bento do Sapucaí-SP) em larga escala, sem a utilização de técnicas artificiais como fornecimento de luz após o pôr do sol e produtos para estimular a brotação, sendo que até o momento não são relatadas produção semelhante em outras regiões no Brasil (MONGELLI et al., 2016; MONGELLI et al., 2015; ROBERTS e WILSON, 2006).

Apesar de o lúpulo ser muito utilizado na fabricação de cerveja e conseqüentemente a maior parte da sua produção ser destinada para esse fim, sabe-se que o mesmo possui outras propriedades, devido à presença de compostos bioativos, aos quais se atribui as suas propriedades biológicas, como efeito sedativo, prevenção contra o câncer, atividade estrogênica, atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Sendo assim, uma ótima fonte de compostos bioativos a ser estudada. Apesar de já existirem alguns estudos que relatam essas atividades, não foram realizados estudos com lúpulos cultivados no Brasil (CHEN et al., 2012; KAVALIER et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010; CESLOVA et al., 2009).

Muitos trabalhos relatam o teor de compostos fenólicos no lúpulo e para extração desses compostos, buscam-se técnicas de baixo custo, que maximizem o rendimento dos compostos desejados sem degradar ou com mínimo de degradação. Desta forma a extração assistida por ultrassom (EAU) pode ser considerada uma técnica adequada para esse fim, por atender as características citadas anteriormente (AL-DHABI et al., 2017; TIWARI et al., 2015; CHEN et al., 2012; KAVALIER et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010).

Devido as suas propriedades o extrato de lúpulo pode ser utilizado como agente antioxidante e antimicrobiano em alimentos e em embalagens para alimentos, gerando assim uma embalagem ativa.

Tradicionalmente a função de uma embalagem para alimento é acondicionar produtos de forma que os protejam contra fatores externos como a luz, umidade, ar, agentes microbianos,

entre outros, que podem prejudicar a qualidade destes produtos até chegar ao consumidor final, além de conter e proteger o alimento a embalagem também exerce a função de informação nutricional e *design* para fácil utilização e venda. Entretanto, a embalagem não é mais só parte essencial para permitir adequada armazenagem e distribuição dos alimentos pode também, integrar o sistema de conservação, mantendo e melhorando a qualidade dos alimentos durante a sua vida útil podendo ser uma embalagem ativa. Esta é definida como a tecnologia na qual o material da embalagem ou que está contido na embalagem possui a capacidade de interagir com o alimento ocasionando benefícios, como ação antioxidante e antimicrobiana (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; OTONI et al. 2016; CUNHA et al., 2007).

Neste contexto, o desenvolvimento de embalagens ativas é um campo de pesquisa importante que vem crescendo e se destacando cada vez mais, pois essa tecnologia pode reduzir e eliminar problemas, como alteração das características nutricionais, sensoriais e perdas alimentares, podendo aumentar a vida de prateleira dos alimentos (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Dessa forma, o intuito deste trabalho foi definir os melhores parâmetros de obtenção do extrato do lúpulo cultivado no Brasil para os compostos fenólicos totais. Realizar a caracterização da composição química do lúpulo produzido no Brasil e do seu extrato além de avaliar o teor de flavonoides, determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, identificação e quantificação dos compostos fenólicos, obter óleos essenciais e caracteriza-lo, comparando os resultados com a mesma variedade proveniente dos EUA para, posteriormente, desenvolver e caracterizar filmes poliméricos biodegradáveis contendo extratos de lúpulo cultivado no Brasil e importado, para uma futura utilização como embalagem ativa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) cultivado no Brasil e nos Estados Unidos EUA, quanto a sua composição físico- química e compostos fenólicos dos extratos, aplicando-o em filmes poliméricos ativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros ótimos para a obtenção dos compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro por EAU;
- Obter extratos fenólicos do lúpulo brasileiro por meio de extração assistida por ultrassom (EAU) utilizando planejamento experimental;
- Quantificar os compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos de lúpulo brasileiro e proveniente dos Estados Unidos;
- Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes nas amostras de lúpulo e em seus extratos;
- Caracterizar o lúpulo de origem brasileira e proveniente dos Estados Unidos quanto a sua composição físico-química;
- Extrair o óleo essencial dos lúpulos por arraste de vapor;
- Caracterizar os óleos essenciais quanto a sua composição química;
- Verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e dos óleos essenciais;
- Produzir filmes poliméricos contendo os extratos de lúpulo;
- Caracterizar os filmes quanto à morfologia, propriedades mecânicas e físico-químicas;
- Determinar a atividade antioxidante dos filmes.

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

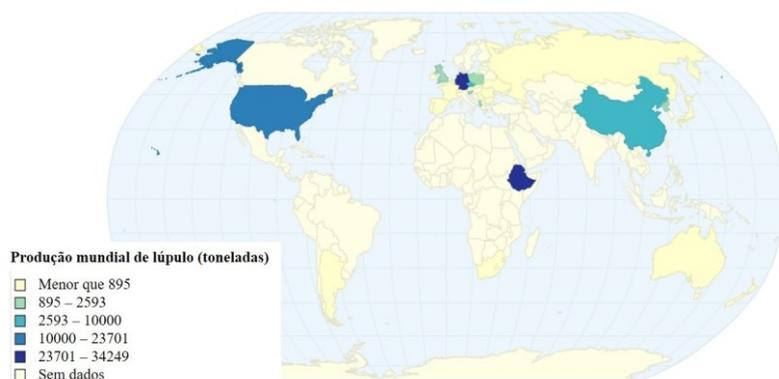
1. LÚPULO

O lúpulo é conhecido principalmente pela sua utilização na fabricação de cerveja, uma matéria-prima ou componente nobre insubstituível, juntamente com o malte, água e leveduras, proporcionando sabor amargo e aroma ao mosto (ZANOLI; ZAVATTI, 2008; GERHUSER, 2005).

Acredita-se que a primeira cerveja tenha sido produzida na Babilônia em 7.000 a.C. e certamente o lúpulo não era usado na fabricação até muito mais tarde. Existem algumas evidências históricas que indicam que o lúpulo foi cultivado pela primeira vez na Europa Central antes de 1.000 d.C. Inicialmente estes não foram utilizados na cerveja, mas sim como parte de medicamentos antigos e remédios de ervas. O primeiro cultivo do lúpulo para utilização em cerveja foi na Alemanha e na República Checa entre 1.000 e 1.200 d. c., sua forma de cultivo e uso logo se espalharam por toda a Europa, com os primeiros colonizadores europeus, para os Estados Unidos e África do Sul (século XVII), Austrália e Nova Zelândia (início do século XIX) e continuou se difundindo durante os anos 1800 e 1900 em vários outros países. O lúpulo, além de seus benefícios de sabor e aroma, chamou a atenção dos primeiros fabricantes de cerveja por relacionarem com as suas características de conservação, que foram importantes antes da introdução da refrigeração (PATZAK et al., 2010; ZANOLI; ZAVATTI, 2008; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Atualmente, o lúpulo é cultivado com sucesso em vários países nos hemisférios norte e sul. Porém, para se obter um crescimento adequado há uma dependência da localização do cultivo e das condições climáticas. O lúpulo é uma cultura típica de climas frios do hemisfério norte, sendo que os maiores produtores são os Estados Unidos, Alemanha e França. No Brasil as condições climáticas não são as mais favoráveis para o seu cultivo, sendo que quase todo o suprimento do país é importado da Europa e dos Estados Unidos, regiões que detêm cerca de 60 % produção mundial total (Figura 1) (MONGELLI et al., 2016; CHADWICK; PAULI; FARNSWORTH, 2006; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Figura 1 - Mapa da produção mundial de lúpulo em 2010

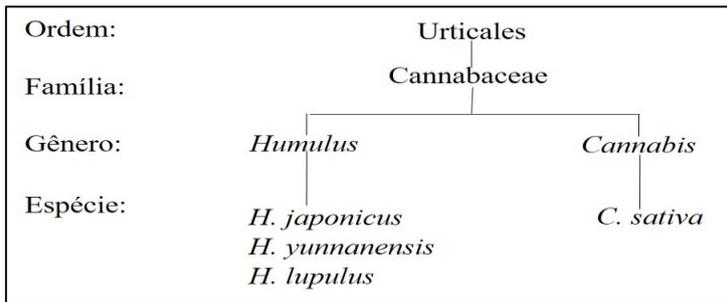


Fonte: Adaptado de ChartsBin, 2017.

Ao longo dos últimos anos foram realizadas algumas tentativas de produção de lúpulo no Brasil com variedades da Europa, onde a planta é originária. Muitas dessas tentativas foram em vão. Porém o cultivo na Serra da Mantiqueira (São Bento do Sapucaí, São Paulo, Brasil) deu certo e em 2016 foram produzidos 2.000 quilos de lúpulo da variedade Cascade. Essa foi a primeira produção de lúpulo em larga escala sem a utilização de técnicas artificiais como fornecimento de luz após o pôr do sol e produtos para estimular a brotação o que poderia ser necessário, pois o cultivo do lúpulo precisa além de baixas temperaturas, de um tempo de exposição à luz variado (fotoperíodo), que varia de entre 9 a 14 horas por dia, o que não ocorre no Brasil (ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Existem três espécies de *Humulus* conhecidas, *H. japonicus*, *H. yunnanensis* e *H. lupulus*, sendo que apenas a última tem valor cervejeiro, as outras espécies carecem de glândulas de lupulina, portanto, não possuem valor para utilização em cerveja, sendo então utilizadas como plantas ornamentais de jardins na China e no Japão onde são cultivadas. *Humulus* e *Cannabis* são os dois únicos gêneros da família Cannabinaceae (Ordem Urticales), a *Cannabis* é representada apenas pela espécie *C. sativa L* como pode ser observado na Figura 2 (ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004; STEVENS; PAGE, 2004; LARSON et al., 1996).

Figura 2 - Classificação do lúpulo

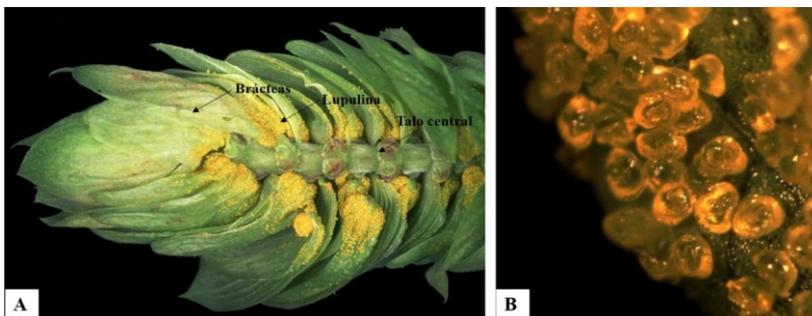


Fonte: O autor, adaptado de Roberts e Wilson, 2006.

Os lúpulos da espécie *H. lupulus* L., são plantas dioicas, o que significa que são plantas masculinas e femininas separadas, mas somente as plantas fêmeas dão forma aos cones do lúpulo, dentro do qual se desenvolvem as importantes "glândulas de lupulina", que possuem coloração amarelada. A planta floresce anualmente a partir de uma variedade cultivada e cuja vida útil média é de 12 a 15 anos (embora exista algumas plantações que continuaram a produzir por mais de 25 anos) (ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

A cor, composição química e forma dos cones de lúpulo são uma das principais características que diferenciam as variedades. De maneira geral, os cones de lúpulo consistem de um talo central ou linha central sobre o qual se desenvolvem estruturas semelhantes a pétalas, chamadas "brácteas". Além das brácteas apresentarem um papel protetor, é na base das brácteas que se desenvolvem as glândulas de lupulina amarela (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura dos cones de lúpulo. A) Identificação da estrutura do cone de lúpulo; B) Glândulas de lupulina



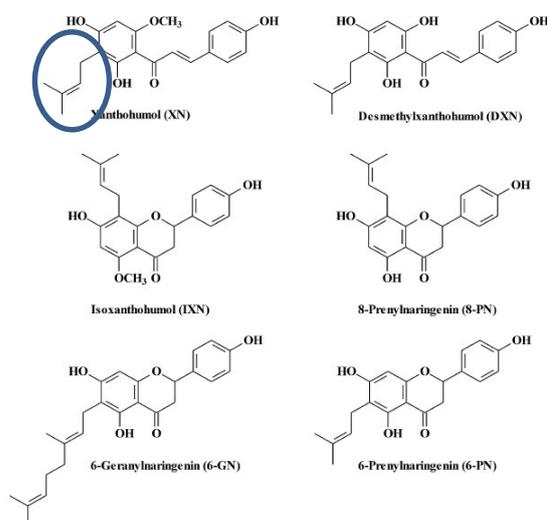
Fonte: Adaptado de Kavalier et al., 2011

Nas glândulas de lupulina está o valor comercial das flores de lúpulo, nelas se encontram os constituintes mais importantes da cerveja, ou seja, as resinas (α -ácidos, responsáveis pelo

amargor na cerveja) e os óleos essenciais (responsáveis pelo aroma da cerveja) (KAVALIER et al., 2011; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Além das características importantes do lúpulo para a indústria cervejeira, estudos comprovam que o mesmo possui também outras propriedades biológicas como efeito sedativo, prevenção contra o câncer, atividade antioxidante, atividade estrogênica, ação pesticida e efeitos antibacteriano e antifúngico. Essas características se dão, pelo lúpulo possuir um elevado teor de prenilflavonoides, uma subclasse dos flavonoides, quimicamente, eles têm um grupo prenil (-CH₂-CH-C-(CH₃)₂) ligado à sua estrutura de flavonoide sendo que os principais e mais importantes compostos determinados no lúpulo de forma geral são o xantumul (XN), isoxantumul (IXN), desmethylxantumul (DMX), 6-prenilnaringenina (6-PN), 8-prenilnaringenina (8-PN) e 6-geranylaringenina (6-GN) (Figura 4) (CHEN et al., 2012; KAVALIER et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010; CESLOVA et al., 2009; GARDEA-TORRESDEY et al., 2002).

Figura 4- Estruturas de prenilflavonóides identificados em amostras de lúpulo



Fonte: Ceslova et al., 2009.

O lúpulo é usado como sedativo e causa este efeito de forma suave. Esta atividade foi investigada em estudos experimentais e clínicos, observando que o mesmo poderia ser utilizado em tratamentos de perturbações do humor, como inquietação, ansiedade e distúrbios do sono, tanto sozinho quanto em combinação com outros sedativos naturais, como a valeriana (*Valeriana officinalis*). A Valeriana é uma planta perene nativa da Europa e da Ásia, e naturalizada na América do Norte. O gênero *Valeriana* inclui mais de 250 espécies. A espécie

de Valeriana mais comumente utilizada na terapêutica é a *Valeriana officinalis* (ZANOLI; ZAVATI, 2008; STEVENS; PAGE, 2004).

O efeito estrogênico do lúpulo foi reconhecido na década de 60, desde então pesquisas vem sendo realizadas para entender melhor essa atividade. Hoje, sabe-se que o principal responsável por esse efeito é o composto, 8-prenilnaringenina, sendo um dos fitoestrógenos mais potentes em comparação com outros antes já conhecidos. Foi observado o potencial estrógeno nos outros prenilflavonoides, porém os efeitos encontrados foram muito menores (ZANOLI; ZAVATI, 2008; CHADWICK; PAULI; FARNSWORTH et al., 2006; GERHAUSER, 2005; STEVENS; PAGE, 2004).

Os compostos do lúpulo possuem ação quimiopreventiva contra o câncer, pois protegem e inibem a formação de tumores. Nos últimos anos vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para avaliar o potencial de atividade do lúpulo como agente quimiopreventivo, desta forma pode-se observar que o componente do lúpulo que apresenta essa atividade é o xantumol (XH) (BLAND et al., 2015; KARABIN et al., 2015; GERHAUSER, 2005).

O potencial antioxidante do lúpulo deve-se aos flavonoides presentes, esses compostos representam o maior grupo de polifenóis vegetais e a sua ingestão alimentar por meio de frutas e vegetais tem sido associada à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, pois os flavonoides presentes nos alimentos têm efeitos benéficos na saúde humana e na prevenção de doenças, o que é atribuído principalmente a suas propriedades antioxidantes. Estudos mostraram que os prenilflavonoides do lúpulo protegem as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da oxidação induzida por Cu^{2+} (BLAND et al., 2015; KARABIN et al., 2015; STEVENS; PAGE, 2004; TROUILLAS et al., 2003).

Além da importante ação antioxidante, os compostos do lúpulo apresentam também ação antimicrobiana. Esta ação ocorre principalmente em bactérias Gram positivas, pois a região hidrofóbica das moléculas presentes no lúpulo interage com a parede celular bacteriana, resultando em um aumento na permeabilidade dos compostos na camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana (FUSSYA et al., 2013; SILVA E FARIA, 2008).

A atividade antibacteriana tem sido estudada, principalmente em bactérias Gram-positivas, como *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces*, além da sua atividade antifúngica contra espécies como *Candida albicans*, *Trichophyton*, *Fusarium* e *Mucor*. Segundo a literatura extratos de diferentes cultivares de lúpulo mostraram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, fungos e até vírus, mas sem influência nas bactérias Gram-negativas, por isso os mecanismos da atividade inibitória ainda estão sendo

investigados (FUSSYA et al., 2013; GERHAUSER, 2005; LARSON et al., 1996; MIZOBUCHI; SATO, 1984).

Outro derivado do lúpulo é o seu óleo essencial que é rico em compostos aromáticos importantes os quais também podem ser responsáveis pelas suas características benéficas, *trans*- β -farnesene, mirceno, α -humulene e β -cariofileno, são compostos presentes nos lúpulos de diversas variedades e já relatados na literatura (MONGELLI et al., 2016; MONGELLI et al., 2015; FARAG; PORZET, 2012).

A produção de lúpulo para preparações à base de plantas com ênfase nas suas atividades biológicas representa um pequeno mercado e não parece ser promovido pela indústria do lúpulo, o mercado do lúpulo é focado principalmente na indústria de cerveja (ZANOLI; ZAVATI, 2008; STEVENS; PAGE, 2004).

Atualmente existem muitas variedades de lúpulo já catalogadas e caracterizadas quanto ao seu perfil aromático e uso adequado. A variedade de lúpulo utilizada para o presente trabalho é a Cascade. O Lúpulo Cascade originou-se do programa de criação do *United States Department of Agriculture* (USDA) por Jack Horner em 1956, liberado para cultivo em 1971 e utilizada comercialmente desde 1976. É um lúpulo considerado aromático de intensidade média, com notas florais, cítricas e picantes, sendo o mais popular utilizado na indústria de cerveja artesanal dos Estados Unidos (MONGELLI et al., 2016; KISHIMOTO et al., 2008; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004). O relatório estatístico Hop Growers of America relata que em 2017 a produção de lúpulo em Cascade nos EUA era de 6180 toneladas.

2. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ULTRASSOM

O objetivo principal em um processo de extração é obter o máximo de rendimento do composto desejado sem degradar ou com mínimo de degradação deste composto, além de minimizar a extração de compostos indesejáveis. A extração sólido-líquido convencional (ESL) é uma técnica que pode incluir, maceração, infusão e extração por "Soxhlet", consumindo muito tempo e grande quantidade de solvente (WANG; WELLER, 2006). A fim de se alcançar os objetivos de uma extração eficaz dos compostos desejados, uma série de novas técnicas para esse fim têm sido propostas, como extração assistida por micro-ondas (EAM), extração por fluido supercrítico (EFS), extração acelerada de solvente (EAS) e extração assistida por ultrassom (EAU). Estas novas técnicas, conhecidas como técnicas de extração a frio, uma vez que a temperatura durante o processo de extração é comparativamente baixa e não afeta a estabilidade dos compostos extraídos, são técnicas simples, rápidas, pouco dispendiosas e

eficazes, com alta reprodutibilidade, alta eficiência de extração em um tempo mínimo, menor uso de energia e aplicabilidade à amostras diversificadas (AL-DHABI et al., 2017; TIWARI et al., 2015; CHEN et al., 2012; JACQUES, 2005).

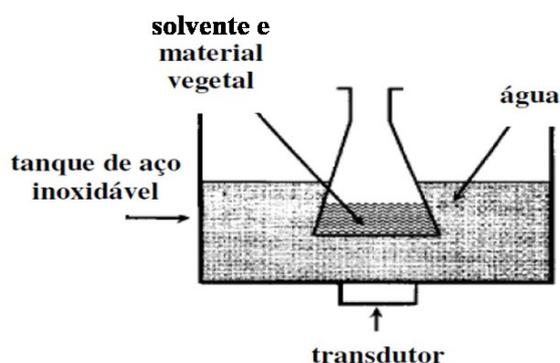
O uso de ultrassom para extração aumentou nas últimas décadas, devido às várias vantagens desse método, como ser um equipamento de uso relativamente simples, versátil e flexível, requerer baixo investimento em comparação com outras novas técnicas de extração, ser uma tecnologia de extração utilizada para várias matrizes, como polissacarídeos, óleos essenciais, proteínas, peptídeos, produtos químicos finos (corantes e pigmentos) e moléculas bioativas, baixo consumo de energia, não utilizá ejeção de CO₂ e não tem consumo de solventes orgânicos tóxicos e os seus resíduos no extrato (TIWARI et al., 2015).

O ultrassom é caracterizado por ondas sonoras transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana, estabelecida entre 20 kHz e 100 MHz, que se propagam em um meio pelo processo de expansão e compressão, gerando um fenômeno chamado de cavitação, que significa o crescimento e colapso de bolhas, que pode produzir efeitos físico, químico e mecânico sobre a matriz. O mecanismo de extração utilizando banho de ultrassom consiste em acelerar o acesso do solvente ao material celular das diferentes partes do vegetal, ocasionando um aumento da transferência de massa (compostos fenólicos) (COSTA et al., 2013; WANG et al., 2008; PIYASENA et al., 2003).

O mecanismo de extração por ultrassom envolve dois tipos principais de fenômenos físicos, a difusão através da parede celular e o enxague do conteúdo da célula depois da quebra das paredes. Desta forma os principais efeitos do ultrassom na extração de matrizes vegetais são o aumento do estresse mecânico das células (ou fricção interfacial), aumento da permeabilidade das paredes celulares, o que facilita a dilatação e hidratação do material através do aumento do tamanho dos poros da parede celular, melhorando o processo de difusão e de transferência de massa. O aumento no tecido celular pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, causando a saída dos compostos aromáticos da célula, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração, e aumentar a área de contato entre o sólido e a fase líquida. Contudo, o efeito do ultrassom no processo de extração depende da frequência e da potência presentes no aparelho (TIWARI et al., 2015; COSTA et al., 2013; MA et al., 2008; WANG et al., 2008; JACQUES, 2005).

No método de extração por ultrassom, a amostra vegetal é misturada com solventes adequados, em um recipiente e colocada no banho ultrassônico, onde a temperatura e o tempo de extração são ajustados. Transcorrido o tempo de extração, o extrato é filtrado e concentrado, se necessário (Figura 5) (JACQUES, 2005; VINATORU et al., 1997).

Figura 5 - Esquema do sistema de banho de ultrassom indireto



Fonte: Vinatoru et al., 1997.

Os fatores controladores e que podem influenciar o processo de extração por ultrassom e, portanto, os mais importantes, são: teor de umidade, tamanho das partículas da amostra, o solvente utilizado, temperatura, pressão, frequência e tempo de sonicação (AZMIR et al., 2013).

A EAU pode também ser utilizada juntamente com várias outras técnicas clássicas de extração para aumentar a eficiência de um sistema convencional (JOYCE et al., 2003). A EAU tem sido utilizada na extração de compostos fenólicos de diferentes partes da planta, tais como folhas (KHEMAKHEM et al., 2017), frutas (SUN et al., 2015), sementes (BRIONES-LABARCA et al., 2015), mas também em cereais (DAS; GOUD; DAS, 2017) e bebidas (AMOFA-DIATUO et al., 2016). He e colaboradores (2016) desenvolveram um método de extração assistida por ultrassom para determinar compostos fenólicos em mirtilo (*Vaccinium ashei*). As seguintes variáveis de extração foram avaliadas: temperatura de extração, quantidades de amostras (proporção sólido-líquido) e tempo total de extração. A extração convencional por solvente (ECS) foi utilizada como referência. O método proposto apresentou resultados para os teores de fenóis totais e antocianinas totais, cerca de 3,2 e 2,5 vezes superiores, respectivamente, ao método de referência. Entretanto, um tempo de extração muito menor foi necessário utilizando a EAU, em 4 minutos 80 % dos compostos fenólicos já haviam sido extraídos, enquanto 35 minutos foram necessários para a ECS.

Segundo Aybastier et al. (2013) que otimizaram as condições experimentais para a EAU de compostos fenólicos de folhas de amora, por meio da metodologia de superfície de resposta. Nas condições obtidas como ótimas (concentração de metanol = 61 % (v/v); temperatura de extração = 66 °C; e tempo de extração de 105 minutos) os compostos fenólicos presentes nas folhas da amora exibiram significativa atividade antioxidante. Foram identificados os ácidos

fenólicos, elágico, cafeico, clorogênico, além dos flavonoides, quercetina, miricetina e kaempferol.

Al-Dhabi et al. (2017) otimizaram a extração de compostos fenólicos, do resíduo do pó de café, utilizando a EAU. As condições otimizadas foram: temperatura de extração de 39,8 °C; potência do ultrassom = 243,9 W, tempo de extração = 33,9 minutos e proporção de sólido: líquido = 1:16,7 g/mL (m/v). A concentração de compostos fenólicos totais foi igual a 36,25 mg EAG/g, o teor de flavonoides totais igual a 4,50 mg QE/g, 1,36 mg/g de ácido clorogênico e 0,53 mg/g de ácido protocatecuico.

Desta forma, são várias as vantagens em utilizar a EAU, incluindo redução do tempo de extração, uso de menores quantidades de solventes orgânicos e energia envolvida no processo, extração seletiva, instrumentação pouco complexa, um custo relativamente baixo, aumento do rendimento de extração e temperaturas reduzidas (AL-DHABI et al., 2017; TIWARI et al., 2015).

3. EMBALAGENS PARA ALIMENTOS

Segundo a Resolução RDC nº 91 de 11 de maio de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) embalagem para alimentos é definida como o artigo que está em contato direto com o alimento, destinado a contê-lo, desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como de adulterações (BRASIL, 2001). Desta forma, tradicionalmente, os materiais de embalagens têm sido selecionados no sentido de ter mínima interação com o alimento que acondicionam e com o ambiente, constituindo assim barreiras inertes. Porém, a embalagem não só é essencial para permitir uma distribuição e preservação eficaz de alimentos e outros produtos de consumo, mas também é parte integrante do sistema de conservação, mantendo e, às vezes, melhorando a qualidade dos alimentos durante a distribuição (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; LIM, 2011).

A embalagem desempenhou um importante papel na globalização e economia alimentar, estabilizando os produtos alimentares de modo que pudessem ser distribuídos por longas distâncias. Além da função de proteção, a embalagem também fornece informações relevantes do produto para os consumidores. Também pode proporcionar a conveniência do uso final (redução no tempo de preparo do alimento, fácil abertura, ser reciclável, entre outros), podendo influenciar a decisão de compra dos consumidores. Assim, a indústria de embalagens, juntamente com ciência e tecnologia de materiais, está em contínua evolução, na busca de

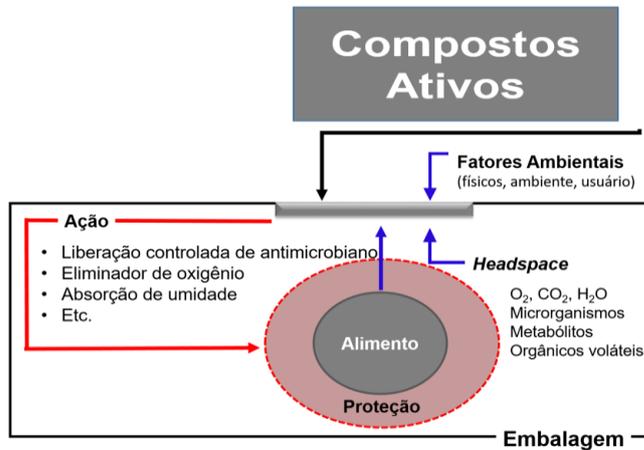
inovações, a fim de atender as exigências do mercado por parte dos consumidores (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; LIM, 2011; CUNHA et al., 2007).

As perdas alimentares, constituem uma grande preocupação econômica para a indústria de alimentos. E a presença de microrganismos deteriorantes nas matérias-primas e nos alimentos processados devido à contaminação cruzada, pode ser apontada como uma das principais razões para a perda de alimentos. Isto resulta em alterações das características nutricionais e sensoriais dos alimentos, tais como oxidação, produção de aromas, sabor e odores desagradáveis, bem como alterações indesejáveis na textura e cor. Além disso, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) contaminados resultam em despesas com cuidados médicos e redução da produtividade, e representam uma ameaça para a saúde pública. Neste contexto as embalagens que possuem funções além das essenciais passam a ter destaque no mercado (OTONI et al. 2016; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

Nas últimas décadas, diversos sistemas de embalagem têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar as suas funções, através de mecanismos interativos movidos por processos físicos, químicos e/ou biológicos. Os sistemas de embalagens inteligentes são aqueles que possuem uma função melhorada com relação às funções de comunicação e *marketing*, de modo a proporcionar *feedback* dinâmico ao consumidor sobre a qualidade real do produto. Por outro lado, a embalagem ativa é focada em fornecer proteção e preservação dos alimentos através de algum mecanismo ativado por fatores intrínsecos e/ ou extrínsecos ao alimento (LIM, 2011; CUNHA et al., 2007).

Existem diferentes conceitos de embalagens ativas para alimentos, incluindo removedores de oxigênio, absorvedores de umidade, barreiras ultravioletas (UV) e outros mecanismos como atividade antioxidante, aromatizante e antimicrobiana (Figura 6). A embalagem antimicrobiana interage com o alimento embalado ou com o espaço livre do pacote, para reduzir, retardar ou mesmo inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, podendo assumir várias formas, como a incorporação direta do composto ativo em uma matriz polimérica, aplicação do composto ativo encapsulado, na superfície da embalagem ou incorporado em sachês (OTONI et al. 2016; GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; DUNCAN, 2011).

Figura 6 - Diagrama esquemático mostrando o conceito de embalagem ativa



Fonte: Adaptado de Mihindukulasuriya e Lim, 2014.

Embalagens que possuem atividade vêm sendo usadas em produtos alimentícios tais como massa fresca, queijo, peixe, carnes (curadas, desidratadas, defumadas) frutas, frutas desidratadas, hortaliças e legumes. Cada um desses produtos tem mecanismos diferentes de deterioração, que deverão ser entendidos para que se possa definir uma embalagem ativa eficiente. Para estudos iniciais das embalagens ativas, são elaborados filmes poliméricos, utilizando diferentes técnicas, como a técnica por *casting*, que é uma ótima opção a ser aplicada, principalmente pela sua fácil obtenção em escala laboratorial, além da completa evaporação do solvente. Dentre os compostos ativos que apresentam propriedades físicas, químicas ou biológicas que permitem ser aplicados podemos listar os óleos essenciais e extratos de plantas, os metais e partículas metálicas, enzimas, bactericidas e compostos químicos (GARRIDO et al., 2016; DA ROSA et al., 2015; MELLINAS et al., 2015; CUNHA et al., 2007).

Os materiais plásticos convencionais são amplamente explorados em nossa vida cotidiana para conter alimentos, especialmente na forma de filmes e embalagens. Apesar do plástico sintético ter proporcionado muitos benefícios para a indústria de alimentos, atualmente tornou-se um sério problema ambiental devido ao seu comportamento físico, químico e biológico desfavoráveis (BAJIĆ et al., 2019).

O desenvolvimento de novas tecnologias e o emprego de novos materiais para a produção de embalagens, incluindo os biopolímeros, tem como foco, entre outros aspectos, a preservação ambiental e a busca de potenciais alternativas para as embalagens convencionais. Pesquisando por materiais que sejam biodegradáveis e biocompatíveis, e assim, não tragam risco para a saúde humana e o meio ambiente. Estes polímeros biodegradáveis geralmente são

derivados de fontes biológicas, como plantas e bactérias, ou seja, recursos renováveis (ATARES; CHIRALT, 2016; CHEN et al. 2016).

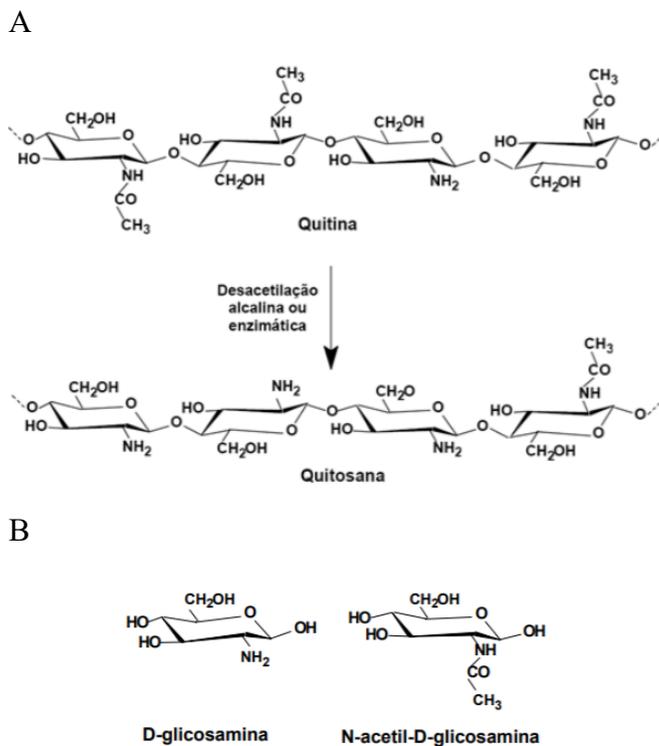
Os filmes biodegradáveis podem ser formados por biopolímeros capazes de formar filmes, esses são classificados quanto à natureza do material utilizado para sua produção que pode ser a base de proteínas, polissacarídeos e lipídeos, provenientes de uma diversidade de matrizes, ou pela mistura de alguns desses componentes (MACHADO, 2017; KESTER; FENNEMA, 1986).

Dentre os polímeros naturais encontra-se a quitosana, derivado parcialmente da desacetilação da quitina, principalmente recuperada do exoesqueleto de artrópodes como o caranguejo e o camarão, sendo assim um polímero produzido por fontes naturais renováveis, que pelas suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade, estão se tornando candidatos notáveis, capazes de produzir uma ampla variedade de materiais que podem ser aplicados na indústria e tecnológica (YOSHIDA et al., 2010; DUTTA et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009).

A quitina primeiramente foi isolada da carapaça dos insetos e passou a chamá-la de quitina (do grego – *Chiton*), que significa carapaça, é amplamente distribuída na natureza, depois da celulose, é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza, sendo comumente extraída do exoesqueleto de crustáceos como caranguejo e camarão, podendo ser obtida a partir de fungos também. A quantidade de quitina varia com o tipo de animal e com as partes do mesmo. Normalmente a quitina é encontrada associada com proteínas, sais minerais, lipídeos e outros compostos, sendo raramente encontrada pura na natureza (BAJIĆ et al., 2019; ALMEIDA, 2009; MOURA, 2008; SOARES et al., 2003; NACZK et al., 2004; MACHOVÁ et al., 1999).

A quitosana é um copolímero da quitina, obtida a partir da hidrólise alcalina ou enzimática (desacetilação) da quitina, consiste na transformação do grupo acetamida (NHCOH_3) em amina (NH_2), por meio da reação com uma base fortemente alcalina e enzima (Figura 7-A), o grupamento amina da quitosana é altamente ativo proporcionando a solubilidade em solução aquosa de ácido acético 1% (v/v), diferenciando-a assim da quitina. A quitosana tem como componente principal unidades do monômero *D*-glicosamina, com poucas unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina em sua formação (Figura 7-B). Quimicamente a quitosana é um amino polissacarídeo catiônico de elevada massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, sendo considerada segura para consumo humano (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) (MUJTABA et al., 2019; BORIWANWATTANARAK et al., 2008; SILVA et al., 2006; JIANG et al., 2005; KUBOTA et al., 2000; KIMURA et al., 1999).

Figura 7 – A - Estruturas químicas da quitina e quitosana; B - Estrutura dos monômeros D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina



Fonte: Oliveira, 2006

Além da quitosana ser considerada um polímero de baixa toxicidade, não alergênico, possui propriedades antibacterianas e antifúngicas (MUJTABA et al., 2019; FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008; CRINI; BADOT, 2008; BERGER et al., 2004).

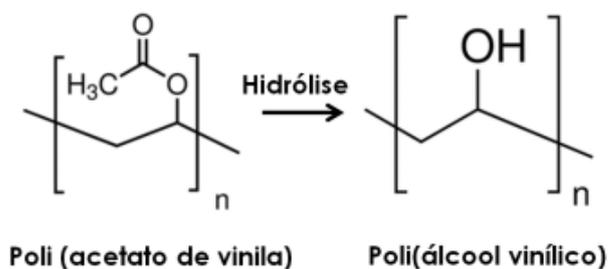
Os filmes biodegradáveis de quitosana apresentam capacidade de reduzir a troca gasosa e migração de umidade, atuando como barreiras semipermeáveis, além de poder atuar no transporte de compostos como, aditivos e agentes antioxidantes, antimicrobianos e flavorizantes, contribuindo para preservação do alimento embalado e atuando assim dentro do conceito das embalagens ativas. Sendo assim, o uso de filmes biodegradáveis como matrizes carregadas

com agentes ativos que auxiliam na manutenção e prolongamento da vida de prateleira dos alimentos de origem vegetal e animal tem sido tema de diversas pesquisas nos últimos anos (BAJIĆ et al., 2019; MUJTABA et al., 2019; CAMILI, 2007; PEN; JIANG, 2003; KUBOTA et al., 2000; KUMAR, 2000).

As misturas de polímeros são de interesse econômico e tecnológico, pois as propriedades do produto final podem ser melhoradas. As propriedades mecânicas e de estabilidade dessas misturas são afetadas diretamente pela estrutura química dos polímeros e as interações entre estes (BERCEA et al., 2015; RHIM, 2012; ABUGOCH et al., 2011).

O PVA álcool polivinílico ou poli(álcool vinílico) é um polímero sintético solúvel em água capaz de formar hidrogéis, atóxico, bicompatível, biodegradável, desempenha excelentes propriedades mecânicas, além de ter um baixo custo, desta forma, é usado nas ciências biomédicas e farmacêuticas. O PVA comercial é frequentemente a forma hidrolisada do poli acetato de vinila, formando o copolímero de poli(álcool vinílico) (Figura 8) (BERCEA; MORARIU; RUSU, 2013; KAYAL; RAMANUJAN, 2010; NEAMTU et al., 2007; DON; KING; CHIU, 2006).

Figura 8 - Estrutura química do poli(álcool vinílico) (PVA)



Fonte: Bercea et al., 2015.

PVA é um dos polímeros muito usados em combinações com quitosana. Filmes biodegradáveis obtidos com a combinação de QTS/ PVA, quando comparados com filmes dos polímeros isolados, podem apresentar melhores propriedades térmicas, mecânicas e viscoelásticas, assim, sendo uma ótima combinação de biomateriais utilizados na incorporação de ativos para obtenção de embalagens ativas, na indústria de alimentos (CHEN et al., 2014; PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012; JIN; BAI, 2002).

REFERÊNCIAS

- MUJTABA, M.; MORSI, R. E.; KERCH, G.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; KHAWAR, K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.121 , p.889–904, 2019.
- ABUGOCH, L. E.; TAPIA, C.; VILLAMÁN, M. C.; YAZDANI-PEDRAM, M.; DÍAZ-DOSQUE, M. Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**. v. 25, n. 5, p. 879-886, 2011.
- AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 34, p. 206–213, 2017.
- ALLAN, C.R.; HADWIGER, L.A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental mycology**. v. 3, n. 3, p. 285-287, 1979.
- AMOFA-DIATUOA, T.; ANANGA, D. M.; BARBAB, F. J.; TIWARIC, B. K. Development of new apple beverages rich in isothiocyanates by using extracts obtained from ultrasound-treated cauliflower by-products: Evaluation of physical properties and consumer acceptance. **Journal of Food Composition and Analysis**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.10.001>.
- ANKER, M.; BERNTSEN, J.; HERMANSSON, A. M.; STADING, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 1, p. 81-92, 2002.
- ATARES, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**. v. 48, p. 51-62, 2016.
- AYBASTIER, O.; IŞIK, E.; ŞAHİN, S.; DEMI, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**. v.44, p. 558-565, 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.;

GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. v.117, p.426–436, 2013.

BAJIĆ, M.; JALŠOVEC, H.; TRAVAN, A.; NOVAK, U.; LIKOZAR, B. Chitosan-based films with incorporated supercritical CO₂ hop extract: Structural, physicochemical, and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v.219, p.261-268, 2019.

BARRETO, M. D. C. S.; FIGUEIREDO, M. D. V. B.; BURTY, H. A.; DA SILVA, M. L. R. B.; DE LIMA-FILHO, J. L. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Current Agricultural Science and Technology**. v. 17, n. 2, 2011.

BERCEA, M.; BIBIRE, E. L.; MORARIU, S.; TEODORESCU, M.; CARJA, G. pH influence on rheological and structural properties of chitosan/poly (vinyl alcohol)/layered double hydroxide composites. **European Polymer Journal**. v. 70, p. 147-156, 2015.

BERCEA, M.; MORARIU, S.; RUSU, D. In situ gelation of aqueous solutions of entangled poly (vinyl alcohol). **Soft Matter**. v. 9, n. 4, p. 1244-1253, 2013.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**. v. 23, n. 24, p. 4827-4832, 2002.

BLAND, J. S.; MINICH, D.; LERMAN, R.; DARLAND, G.; LAMB, J.; TRIPP, M.; GRAYSON, N. Isohumulones from hops (*Humulus lupulus*) and their potential role in medical nutrition therapy. **Pharma Nutrition**. v. 3, p. 46–52, 2015.

BORIWANWATTANARAK, P.; INGKANINAN, K.; KHORANA, N.; VIYUCH, J. Development of curcuminoids hydrogel patch using chitosan from various sources as

controlled-release matrix. **International journal of cosmetic Science**. v. 30, n. 3, p. 205-218, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens**. Norma Aprovada. Resolução RDC nº 91 de maio de 2001.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and practice*. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap.7.

BRIONES-LABARCA, V.; PLAZA-MORALES, M.; GIOVAGNOLI-VICUNA, C.; JAMETT, F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. **LWT - Food Science and Technology**. v. 60, p. 525-534, 2015.

CAMILLI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**. v.33, p.3, p.215-221, 2007.

CESLOVA, L., HOLCĀPEK, H.; FIDLER, M.; DRŠTICĀKOVA, J.; LISA, M. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.7249–7257, 2009.

CHADWICK, L. R.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. **Phytomedicine**. v. 13, p. 119–131, 2006.

CHEN, G.; GUO, J.; NIE, J.; MA, G. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core Shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. **Polymer**. v. 83, p. 12-19, 2016.

CHEN, Q.; CABANAS-POLO, S.; GOUDOURI, O. M.; BOCCACCINI, A. R. Electrophoretic co-deposition of polyvinyl alcohol (PVA) reinforced alginate–Bioglass® composite coating on stainless steel: Mechanical properties and in-vitro bioactivity assessment. **Materials Science and Engineering**. v. 40, p. 55-64, 2014.

CHEN, Q.; FU, M.; CHEN, M.; LIU, J.; LIU, X.; HE, G.; PU, S. Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**. v. 132, p. 619–623, 2012.

CHEN, W.; WANG, W.P.; ZHANG, H.S.; HUANG, Q. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, p. 614–619, 2012.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; JESUS, A. L. T.; ALMEIDA, F. D. L.; MIRANDA, M. R. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. **Food Bioprocess Technology**. v.6, p. 997– 1006, 2013.

CRINI, G.; BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in polymer Science**. v. 33, n. 4, p. 399-447, 2008.

CUNHA, L. R.; SOARES, N. F. F.; ASSIS, F. C. C.; MELO, N. R.; PEREIRA, A. F.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 23-26, 2007.

DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; DE CARVALHO, S. M.; DE MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T.; MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 481, p. 337-344, 2015.

DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. **Industrial Crops and Products**. v. 95, p. 332–341, 2017.

DE ALMEIDA, É. V. R. Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DON, T.M.; KING, C.F.; CHIU, W.Y.; PENG, C.A. Preparation and characterization of chitosan-g-poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 331-339, 2006.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 363, p. 1e24, 2011.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, 114, 1173-1182, 2009.

FARAG M. A.; PORZEL A.; SCHMIDT J.; WESSJOHANN L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Journal Metabolomics**. V.8, p.492-507, 2012.

FUSSYA, Z.; PATZAKC, J.; STEHLIKB, J.; MATOUSEK, J. Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. **Journal of Plant Physiology**. v. 170, p. 688– 695, 2013.

GARDEA-TORRESDEY, J.; HEJAZI, M.; TIEMANN, K.; PARSONS, J.G.; DUARTE-GARDEA, M.; HENNING, J. Use of hop (*Humulus lupulus*) agricultural by-products for the reduction of aqueous lead (II) environmental health hazards. **Journal of Hazardous Materials**. v. 91, p. 95–112, 2002.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agentes. **European Journal of Cancer**. v. 41, p. 1941–1954, 2005a.

GERHAUSER, C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 49, p. 827–31, 2005b.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GRAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**. v. 25, p. 42–51, 2014.

HE, B.; ZHANG, L.; YUE, X.; LIANG, J.; JIANG, J.; GAO, X.; YUE, P. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**. v. 204, p.70–76, 2016.

JACQUES, R. S. Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JIANG, Y.; LI, J.; JIANG, W. Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. **LWT - Food Sci Technol**. v. 38, p. 757-761, 2005.

JIN, L.; BAI, R. Mechanisms of lead adsorption on chitosan/PVA hydrogel beads. **Langmuir**, v. 18, n. 25, p. 9765-9770, 2002.

JOYCE, E.; PHULL, S. S.; LORIMER, J. P.; MASON, T. J. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.10, p. 315-318, 2003.

KARABIN, M.; HUDCOVA, T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 1063–1090, 2015.

KAVALIER, A. R.; LITT, A.; MA, C.; PITRA, N. J.; COLES, M. C.; KENNELLY, E. J.; MATTHEWS, P. D. Phytochemical and Morphological Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Cones over Five Developmental Stages Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry, Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection, and Light Microscopy Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 4783–4793, 2011.

KAYAL, S.; RAMANUJAN, R. V. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 3, p. 484-490, 2010.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food technology (USA)**, 1986.

KHEMAKHEM, I.; AHMAD-QASEM, M. H.; CATALÁN, E. B.; MICOL, V.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; AYADI, M. A.; BOUAZIZ, M. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 34, p. 466–473, 2017.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES, A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 3, p. 51-57, 1999.

KISHIMOTO, T.; KOBAYASHI, M.; YAKO, N.; IIDA, A.; WANIKAWA, A. Comparison of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one Contents in Hop Cultivars from Different Growing Regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 1051–1057, 2008.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half Nacetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 268–274, 2000.

LARSON, A. E.; YU, R. R. Y.; LEE, O. A.; PRICEA, S.; HAAS, G. J.; JOHNSON, E. A. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 33, p. 195-207, 1996.

LIM, L. T. Active and intelligent packaging materials (2nd ed.). In: Comprehensive biotechnology, Amsterdam. **The Netherlands: Elsevier**. p. 629-644, 2011.

MACHADO, M. H. Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos. 2017. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

MACHOVÁ, E.; KVAPILOVA, K.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin–glucan complex from *Aspergillus niger*. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 5, n. 4, p. 169-172, 1999.

MAGALHÃES, P. J.; VIEIRA, J. S.; GONÇALVES, L. M.; PACHECO, J. G.; GUIDO, L. F.; BARROS, A. A. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 3258–3268, 2010.

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, K.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7244-7248, 2002.

MELLINAS, C.; VALDÉS, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGÓS, M. C.; JIMÉNEZ, A. Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 133, p. 42631, 2015.

MIHINDUKULASURIYA, S.D.F.; LIM, L.-T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MIZOBUCHI, S.; SATO, Y. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 48, p. 2771-2775, 1985.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; CALIGIANI, A.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Are Humulus lupulus L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A phytochemical approach. **Industrial Crops and Products**. v. 83, p. 693–700, 2016.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Italian hop germplasm: Characterization of wild Humulus lupulus L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**. v. 70, p. 16–27, 2015.

MOURA, Márcia R. D.; AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz HC. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of colloid and interface science**, v. 321, n. 2, p. 477-483, 2008.

NEAMTU, I.; CHIRIAC, A.P.; NITA, L.E.; BERCEA, M.; STOLERIU, A. Investigation of poly (aspartic acid)/vinyl polymer interpolymer complex. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 9, n. 4, p. 981-984, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. Caracterização dos efeitos de quitosanas na inibição de fungos fitopatogênicos. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2006.

OTONI, C. G.; ESPITIA, P. J. P.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60–73, 2016.

PATZAK, J.; NESVADBA, V.; HENYCHOVA, A.; KROFTA, K. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, p. 136–145, 2010.

PARPARITA, E.; CHEABURU, C. N.; VASILE, C. Morphological, thermal and rheological characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends. **Cellulose Chem. Technol**, v. 46, p. 571-581, 2012.

PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 36, n. 3, p. 359-364, 2003.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.87, p.207- 216, 2003.

ROBERTS, T. R.; WILSON, R. J. H., 2006. Hops. In G. G. S. FERGUS G. PRIEST (Ed.), *Handbook of Brewing* (2nd ed., pp. 177–281). Boca Raton: Taylor & Francis. Schroeter, H. and Boyd, C.

RHIM, J.W. Physical Mechanical Properties of Agar/ κ -Carrageenan Blend Film and Derived Clay Nanocomposite Film. **Journal of food science**. v. 77, n. 12, p. N66-N73, 2012.

SILVA, HÉLIO SR; DOS SANTOS, KÁTIA SCR; FERREIRA, ELIZABETH I. Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, P. H A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, p. 902-906, 2008.

SOARES, N. D. F. F.; SILVA, D. F. P.; CAMILLOTO, G. P.; OLIVEIRA, C. P.; PINHEIRO, N. M.; MEDEIROS, E. A. A. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 33, n. SPE1, p. 281-289, 2011.

Statistical report, Presented by Hop Growers of America - USA hop, 2017.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. **Phytochemistry**. v. 65, p.1317–1330, 2004.

SUN, C-Z.; LU, C-T.; ZHAO, Y-Z.; GUO, P.; TIAN, J-L.; ZHANG, L.; LI, X-K.; LV, H-F.; DAI, D-D.; LI, X. Characterization of the doxorubicin-Pluronic F68 conjugate micelles and their effect on doxorubicin resistant human erythroleukemic cancer cells. **Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 2, p. 114-120, 2011.

SUN, Y.; SHEN, Y.; LIU, D.; YE, X. Effects of drying methods on phytochemical compounds and antioxidant activity of physiologically dropped un-matured citrus fruits. **LWT - Food Science and Technology**. v. 60, p. 1269-1275, 2015.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**. v.71, p.100–109, 2015.

TROUILLAS, P.; CALLISTEA, C.; ALLAISC, D.; SIMONB, A.; MARFAKA, A.; DELAGEB, C.; DUROUXA, J. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**. v. 80, p. 399–407, 2003.

VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P. I.; LAZURCA, D.; MASON, T. J. The ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.4, p. 135-139, 1997.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**. v. 106 p. 804–810, 2008.

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends Food Science Technology**. v. 17, p. 300–312, 2006.

YOSHIDA, C. M. P.; BASTOS, C. E. N.; FRANCO, T. T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 584-589, 2010.

YOSHIDA, C. M. P.; OLIVEIRA, E. N.; FRANCO, T. T. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 383–396, 2008.

CAPÍTULO 2: Compostos bioativos, atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro* do extrato do lúpulo brasileiro e dos EUA (*Humulus lupulus* L. var. Cascade)

Parte deste capítulo foi publicado:

Almeida, A. R., Maciel, M. V. O. B., Machado, M. H., Bazzo, G. C., Armas, R. D., Vitorino, V. B., Vitali, L., Block, J. M., Barreto, P. L. M. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*. doi:10.1111/ijfs.14311

RESUMO

Os compostos bioativos (CB) de *Humulus lupulus* L. var. Cascade provenientes de do brasileiros (LB) foram extraídos pelo método de ultrassom e seu perfil fenólico foi comparado com fontes comerciais de lúpulo provenientes dos EUA (LU). Com o auxílio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), as condições de extração mais eficazes para os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinadas: etanol (solvente) a 49% (v/v), temperatura de extração de 52°C e razão sólido/líquido de 1 g/34 mL (m/v). O teor de flavonoides totais (TFT), identificação e quantificação de CB por LC-ESI-MS/MS, além de atividade antioxidante e concentração inibitória mínima (CIM) contra diferentes microrganismos também foram avaliados. Comparativamente ao LU, a amostra LB apresentou maior teor de CFT ($33,93 \pm 0,67$ mg EAG g⁻¹) e TFT ($54,47 \pm 0,10$ mg EQ g⁻¹) e consequentemente maior atividade antioxidante (ABTS: EC₅₀ $21,29 \pm 1,36$ µL mL⁻¹; DPPH: EC₅₀ $3,91 \pm 0,17$ µL mL⁻¹). Flavonoides como isoquercetina e quercetina foram identificados em maior quantidade em ambos os extratos de lúpulo (líquido e seco). Entre os microrganismos testados, os extratos de lúpulo apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) contra, *Staphylococcus aureus* (100 µL mL⁻¹), *Bacillus cereus* (100 µL mL⁻¹) e *Proteus mirabilis* (300 µL mL⁻¹) (300 µL mL⁻¹). Com base nesses estudos, pode-se afirmar que os extratos possuem potencial antioxidante e antimicrobiano e tem potencial para aplicação em alimentos, a fim de proporcionar uma conservação natural.

Palavras-chave: Lúpulo; Agente antioxidante; Agent antimicrobiana; Compostos fenólicos; Flavonoides.

ABSTRACT

Bioactive compounds (BC) from *Humulus lupulus* L. sourced from Brazilian (BH) cultivars were extracted by the ultrasound method and their phenolic profile was compared to commercial hops sources from USA (UH). With the aid of a Central Composite Rotatable Design (CCRD), the most effective extraction conditions for the total phenolic compounds (TPC) were determined: using 49% (v/v) ethanol, at 52 °C and solid/liquid ratio of 1 g/34 mL (m/v). The total flavonoids content (TFC), identification and quantification of BC by LC-ESI-MS/MS, in addition to antioxidant activity, and minimal inhibitory concentration (MIC) against different microorganisms were also assessed. Comparatively to the UH, sample BH showed higher content of TPC (33.93 ± 0.67 mg GAE g⁻¹) and TFC (54.47 ± 0.10 mg QE g⁻¹) and consequently higher antioxidant activity (ABTS: EC₅₀ 21.29 ± 1.36 μL mL⁻¹; DPPH: EC₅₀ 3.91 ± 0.17 μL mL⁻¹). Flavonoids such as isoquercitrin and quercetin were identified in greater quantity in both hops samples using chromatography. Among the tested microorganisms, the hop extracts were efficient against *Staphylococcus aureus* (100 μL mL⁻¹), *Bacillus cereus* (100 μL mL⁻¹) and *Proteus mirabilis* (300 μL mL⁻¹). Based on these studies it can be stated that the extracts have an antioxidant and antimicrobial potential and can be applied in foodstuffs in order to provide a natural conservation.

Keywords: Brazilian hops; Antioxidant Activity; Antimicrobial Activity; Phenolic Compounds; Flavonoids.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, em 2016, foi o terceiro maior produtor de cerveja mundial (14,1 bilhões de litros), depois da China e dos EUA (CERVBRASIL, 2018). Importa 4 mil toneladas por ano de lúpulo para a produção de cerveja (ZANOLI e ZAVATTI, 2008; GÖRHUSER, 2005). Entre as diferentes espécies conhecidas de lúpulo, *H. lupulus* L. é a única espécie que pode ser usada na produção de cerveja, pois essa é a única que produz as glândulas de lupulina (ROBERTS e WILSON, 2006).

O lúpulo é uma cultura típica de climas frios do hemisfério norte, atualmente os Estados Unidos, Alemanha e França são os maiores produtores do mundo. A localização da cultura e as condições climáticas são muito importantes para alcançar o desenvolvimento e o crescimento adequado das plantas. As condições climáticas do Brasil são geralmente desfavoráveis para o cultivo de lúpulo, portanto toda a oferta de lúpulo é importada da América do Norte e da Europa. No entanto, nos últimos anos, algumas tentativas de adaptar variedades europeias e norte americanas às condições climáticas brasileiras foram feitas. Em 2016, na cidade de São Bento do Sapucaí (SP), foram produzidos 2000 kg de lúpulo da variedade Cascade. Foi a primeira produção brasileira em grande escala sem o uso de técnicas artificiais (MONGELLI et al., 2016; MONGELLI et al., 2016; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

Muitas variedades diferentes de lúpulo *H. lupulus* são usadas pelas cervejarias por causa de suas características aromáticas únicas. A variedade Cascade foi desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 1956, liberada para cultivo em 1971 e é utilizada comercialmente desde 1976 (MONGELLI et al., 2016; ROBERTS e WILSON, 2006; BRIGGS et al., 2004).

O lúpulo é rico em flavonoides (catequina, quercetina, kaempferol e miricetina) e prenilflavonóides (xantumol), que exercem propriedades fitoestrogênicas e antioxidantes, bem como prevenção contra o câncer, atividade pesticida e efeitos sedativos (BLAND et al., 2015; KAVALIER et al., 2011). Diversos estudos na literatura indicam que extratos de diferentes cultivares de lúpulo possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, fungos e vírus (BLAND et al., 2015; CHEN et al., 2012; KAVALIER et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2010; CESLOVA et al., 2009; GARDEA-TORRESDEY et al., 2002; FUSSYA et al., 2013; GERHAUSER, 2005; MIZOBUCHI; SATO, 1984).

A extração dos compostos fenólicos utilizando ultrassom a baixa temperatura é uma técnica de baixo custo, eficiente para extrair os compostos desejados com mínima alteração das

propriedades organolépticas destes materiais (AL-DHABI et al., 2017; TIWARI, 2015; CHEN et al., 2012). A eficiência da extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes pode ser influenciada por diversos parâmetros, como métodos de extração, temperatura, concentração, tempo, polaridade do solvente, entre outros, e seus efeitos podem ser independentes ou interativos. O uso de ferramentas estatísticas pode otimizar o processo de extração de diferentes compostos bioativos como compostos fenólicos e flavonoides (WANG et al., 2008).

Considerando a grande produção e consumo de cerveja no Brasil, o potencial de expansão do cultivo de lúpulo doméstico é significativo para reduzir os custos de produção e a qualidade do produto. No entanto, a composição química dessas variedades domésticas precisa ser investigada e comparada com variedades importadas. Neste estudo foi determinado o perfil fenólico do lúpulo cultivado no Brasil. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para determinar as condições ótimas para a extração por ultrassom considerando os parâmetros de extração mais representativos (concentração de etanol, temperatura e relação sólido / líquido). O total de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante e atividade antibacteriana *in vitro* de variedades brasileiras (LB) e importadas dos EUA (LU) foram comparados para determinar o potencial de aplicação em alimentos como conservante natural, com base em suas características antioxidantes e antimicrobianas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade e de origem brasileira (LB), utilizado neste trabalho, foi gentilmente doado pela empresa Brasil Kirin (Itu, São Paulo).

As amostras foram cultivadas entre os meses de outubro de 2015 e abril de 2016, na cidade de São Bento do Sapucaí, estado de São Paulo, Brasil, com localização geográfica de coordenadas 22°37'32.3"S 45°34'54.0"W, colhida na primeira semana de abril de 2016. As amostras de lúpulo foram armazenadas a vácuo, à -20 °C e ao abrigo da luz, até o envio para o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC), Florianópolis – SC. As amostras recebidas foram liofilizada (JJ Científica, modelo LJJ02, Brasil) a -52 °C e 0,381 mmHg de vácuo por 24 horas, em seguida trituradas em moinho de facas (Quimis, modelo Q298A21, Brasil) e armazenadas em embalagem de polietileno, ao abrigo da luz a -20 °C, até a realização dos experimentos.

A amostra de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade, proveniente dos EUA (LU) a partir da safra de 2016, é uma mistura proveniente do Bend Oregon a Wenatchee Washington, foi gentilmente cedida, na forma de *pellets*, pela empresa de insumos para produção de cervejas Brewtime (São José dos Campos, São Paulo) e armazenada em condições iguais da amostra de LB.

O reagente de Folin-Ciocalteu foi obtido da Dinâmica (Diadema, Brasil). Os reagentes ABTS e DPPH foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e o caldo Müller-Hinton e ágar nutriente da Kasvi (São José dos Pinhais, Brasil). Todos os padrões utilizados foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, EUA) e outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO

O planejamento experimental foi realizado para a otimização dos parâmetros de extração dos compostos fenólicos totais (CFT) do lúpulo LB segundo Wang et al., (2008) com modificações. Foi avaliada a influência de três variáveis independentes no processo de extração (solução hidroalcoólica de etanol (%) (v/v); temperatura de extração (°C) e razão sólido-líquido (g/X mL) sobre a variável dependente ou resposta (concentração de CFT). Para o planejamento experimental foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com oito

pontos fatoriais, seis axiais e quatro repetições no ponto central, totalizando dezoito experimentos. As variáveis e os níveis empregados com os valores reais estão apresentados na Tabela 1. O planejamento por DCCR foi realizado primeiramente as amostra LB, e posteriormente as condições ótimas foram aplicadas para a extração de LB e LU.

Tabela 1 - Variáveis e níveis empregados no Delineamento Composto Central Rotacional para otimização da extração dos compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB) (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade

Variáveis	Níveis codificados				
	$-\alpha$ (-1,68)	-1	0	+1	$+\alpha$ (1,68)
	Níveis verdadeiros				
Concentração de etanol (%)	43	50	60	70	77
Temperatura de extração (°C)	33	40	50	60	67
Proporção sólido: líquido (g/X mL)	17	20	25	30	33

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 7.0 e o conteúdo fenólico total foi tomado como a resposta (Y). A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi usada para modelar a extração de CFT do lúpulo brasileiro (LB). Para isto, um modelo polinomial de segunda ordem foi utilizado na análise dos dados experimentais mostrado na Equação 1.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i x_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Onde:

Y é a resposta prevista, β_0 é constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão linear, quadrático e de interação, respectivamente. X_i e X_j são as variáveis independentes.

2.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Uma amostra de 1 g do lúpulo LB liofilizado foi suspensa em uma solução extratora com diferentes concentrações de etanol. Cinco proporções do solvente de extração foram testadas, 57:43, 50:50, 40:60, 30:70, 23:77 de água e etanol, respectivamente e cinco proporções de sólido: líquido, 1:17, 1:20, 1:25, 1:30, 1:33 em g: mL.

A extração por ultrassom foi realizada em um banho ultrassom (Ultronique, modelo Q5.9137A, Brasil) com um volume útil de 5,7 L (dimensões internas de 30x15x15 cm) a frequência de trabalho e tempo foram fixados em 37 kHz por 30 minutos, as temperaturas de extração de 33, 40, 50, 60, 67 °C foram testadas. Após a extração as amostras foram centrifugadas por 25 minutos e 5000 rpm (Hermli, modelo Z200A, Alemanha), o sobrenadante foi retirado e filtrado em papel filtro Whatman N° 1, inertizado com nitrogênio e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (6 ± 2 °C). Estas amostras foram submetidas a determinação dos CFT.

2.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

Os CFT presentes no lúpulo foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI JUNIOR; SINGLETON, 1965). Em um tubo de ensaio misturou-se 150 µL do extrato, 7500 µL de água destilada e 750 µL de reagente Folin-Ciocalteu, depois de 3 minutos adicionou-se 2250 µL de carbonato de sódio 15 %, 4350 µL de água destilada e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (BEL- PHOTONICS, modelo SP2000 UV, Brasil) a 765 nm após 2 horas ao abrigo da luz. A curva padrão foi preparada com ácido gálico, nas concentrações de 0,05, 0,25, 0,45, 0,65, 0,85, 1,05 (mg/ mL), os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (Sigma-Aldrich, 99 % de pureza) por g em 100 g de peso seco de amostra de lúpulo.

2.5 DETERMINAÇÃO DE TEOR FLAVONOÍDES TOTAIS (TFT)

A análise de flavonoides dos extratos de lúpulo foi realizada segundo a metodologia de Chang et al., (2002). Uma alíquota de 500 µL de solução da amostra foi misturada com 1,5 mL de etanol 95 % e na sequência adicionou-se 0,1 mL de uma solução de cloreto de alumínio hexoidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (10 % m/v), 0,1 mL de acetato de potássio (KCH_3CO_2) 1 M e 2,8

mL de água destilada. Após 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro (BEPHONICS, modelo SP2000 UV, Brasil) a 415 nm. Um branco foi preparado substituindo a amostra pela mesma quantidade de água destilada (CHANG et al., 2002). A curva analítica foi elaborada com quercetina (Sigma-Aldrich, 98% de pureza), nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 (mg/ mL), os resultados foram expressos em mg de equivalente de quercetina por g de amostra seca de lúpulo.

2.6 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) foi realizada para análise dos extratos de lúpulo LB e LU com o objetivo de observar os grupamentos químicos presentes nos mesmos. Os espectros no infravermelho foram obtidos em equipamento Frontier Spectrometer (PerkinElmer, FT-IR/ Frontier, Brasil) com transformada de Fourier, na faixa situada entre 600 a 4000 cm^{-1} com média de 32 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . Todas as leituras foram realizadas em temperatura ambiente (20 ± 5 °C).

2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS EXTRATOS DE LÚPULO POR LC-ESI-MS/MS

Para a separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos as amostras foram previamente preparadas e depois analisadas segundo descrito por Schulz et al., (2015), com modificações. Primeiramente as amostras secas por liofilização foram desengorduradas, 1 g dessas amostras foram desengorduradas com 25 mL de hexano em agitador magnético (Dist, Brasil) por 15 minutos a 25°C, seguida de centrifugação a 4000 rpm (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha) por 15 minutos. O sobrenadante foi então removido e o resíduo submetido a duas outras extrações com hexano. A amostra desengordurada foi submetida à secagem em estufa (Tecnal, TE-395, Brasil) a 30 °C até a remoção completa do solvente. Em seguida foi realizada a extração conforme otimizado e descrito no item 2.3, uma alíquota de 5 mL de extrato líquido (brasileiro = LBL; EUA = LUL) ou 1 g de extrato liofilizado (brasileiro = LBS; EUA = LUS), foram hidrolisados com 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 mol/L, logo após a solução foi ajustada para pH 2 com NaOH 6 mol/L e submetida a extração por partição com 10 mL de éter etílico. O extrato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha). O resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição com éter etílico, os

sobrenadantes combinados foram rotaevaporados (Fisatam, Modelo 558, Brasil) até completa secagem (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha) e o extrato residual suspenso em 1 mL metanol, centrifugado durante 4 minutos a 14000 g (Eppendorf 22331, Hamburgo, Alemanha), diluídos 10 vezes em metanol: água (70:30) para injeção em sistema HPLC-ESI-MS/MS.

A separação cromatográfica e análise espectrométrica das massas foi realizada em um cromatografia líquido de alta eficiência, modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadrupolo e *ion trap* linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSpray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) em modo negativo. O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos. Os compostos foram separados em coluna Synergi™ (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i., Phenomenex, EUA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95 % e água 5 % (A) e de água com ácido fórmico 0,1 % (B). A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90 % A; 7 – 10 min, 90 % A; 10 – 17 min, 10 % A. O fluxo utilizado foi de 250 µL/min e o volume de injeção foi de 10 µL.

Os compostos foram monitorados utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos através da comparação com os respectivos padrões disponíveis comercialmente. A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de soluções contendo cada um dos 46 composto de interesse individualmente. A quantificação foi realizada monitorando um íon quantitativo selecionado para cada composto e utilizando curva de calibração construída em razão dos compostos previamente identificados. Os resultados de concentração dos compostos nas amostras foram expressos em mg por 100 mL de extrato líquido desengordurado e mg por 100 g de extrato desengordurado.

A análise foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados (INCT- Catálise) no departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.8.1 Ensaio de inibição do radical DPPH•

A análise foi realizada de acordo com Mensor et al., (2001) com adaptações. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes para LB e LU (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de EC_{50} (concentração efetiva) foram calculados por regressão linear onde a abscissa representa a concentração da amostra testada e a ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante realizada em triplicata (SIM e SIL, 2008).

A solução de 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada utilizando 0,012 g de DPPH• suspensos em 100 mL de etanol 95 %.

Para o preparo das amostras, foi utilizada uma alíquota de 2,5 mL da amostra diluída, com 1,0 mL de solução DPPH•. Para o controle negativo a amostra foi substituída por 2,5 mL de etanol 95 % e para o branco de cada uma das concentrações foi utilizado etanol 95 % no lugar do reagente DPPH•. Em seguida as amostras foram deixadas ao abrigo da luz por 30 minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (BEL- PHOTONICS SP2000 UV, Brasil) a 518 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (% AA) utilizando a Equação 2.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (2)$$

Onde:

AA (%) = Atividade antioxidante;

$Abs_{amostra}$ = Absorbância da amostra;

Abs_{branco} = Absorbância do controle em branco;

$Abs_{controle}$ = Absorbância do controle negativo.

2.8.2 Ensaio de inibição do radical ABTS•⁺

O ensaio de atividade antioxidante pelo método de ABTS•⁺ (ácido 2,2'-azinobis3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizado baseado na metodologia descrita por Thaipong et al., (2006). O radical ABTS•⁺ formado pela reação de duas soluções estoque de $7,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de ABTS•⁺ com $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de persulfato de potássio, ambas em água destilada

e misturadas em proporções iguais, foi incubado ao abrigo da luz e temperatura ambiente (20 ± 5 °C) por 12 horas.

Depois de formado o radical a solução foi diluída pela mistura de 1 mL de solução de ABTS^{•+} com 60 mL de metanol para se obter uma absorbância de 1,1 a 734 nm. A partir dos extratos de lúpulo, foram preparadas cinco concentrações (200, 350, 600, 750 e 900 µg/mL) para o lúpulo LB e LU, todas em triplicata.

Em ambiente escuro, um volume de 2,85 mL da solução de radical ABTS^{•+} foi acrescentado a 150 µL de cada diluição. As absorbâncias foram lidas após 2 horas em espectrofotômetro à 734 nm, para o controle negativo foi utilizada metanol ao invés de extrato e para o branco de cada uma das concentrações foi utilizado metanol no lugar do reagente ABTS^{•+}. As absorbâncias foram convertidas em porcentagem da atividade antioxidante (%AA) utilizando a Equação 2. Os valores foram expressos pelo cálculo do EC₅₀.

2.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMADOS EXTRATOS DE LÚPULO

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos de lúpulo LB e LU foi realizada de acordo com metodologia proposta por Brasil (2003). Os extratos foram testados quanto a sua ação antimicrobiana contra as bactérias Gram- negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Proteus mirabilis* (ATCC 35659); e as bactéria Gram-positivas: *Lactobacillus casei* (ATCC B6093), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Bacillus cereus* (ATCC 10876). O inóculo foi preparado a partir de cepas previamente reativadas (Ágar Nutriente, a 37 °C durante 24 h), através do padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland em solução salina (0,9 %). O inóculo obtido ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL) foi diluído até concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/ mL para posterior inoculação na placa de microdiluição (concentração final de $1,5 \times 10^5$ UFC/ mL).

Foram utilizadas microplacas de fundo reto com 96 poços, em cada poço foi adicionado 90 µL de caldo Mueller Hinton (MH) (Kasvi, Brasil), 10 µL dos extratos nas diluições de 10 a 90 %, e 5 µL do inóculo. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h (Quimis, Q316M5, Brasil). Para a determinação da CIM, a turbidez dos poços foi observada e comparada com os controles positivos (caldo MH, etanol a 49% e inóculo) e negativos (caldo MH, extratos e antibiótico). Os resultados foram expressos em concentração (µL mL⁻¹) de extratos de LB e LU, necessários para inibir o crescimento microbiano dos ensaios realizados em triplicata.

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos para as determinações realizadas em triplicata foram expressos como médias e desvio padrão. Os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DO LÚPULO BRASILEIRO

Com base nas investigações do efeito da concentração de etanol, temperatura de extração e proporção sólido-líquido, a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada com o objetivo de determinar as melhores condições para a extração de compostos fenólicos totais (CFT) do lúpulo brasileiro (LB) e foi obtida a partir de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). De modo geral, a eficiência da extração de um composto é influenciada por vários parâmetros, tais como temperatura, concentração, tempo e polaridade do solvente, entre outros, e seus efeitos podem ser independentes ou interativos. A utilização desta ferramenta estatística tem possibilitado a obtenção otimizada de biomoléculas, que no caso deste trabalho são os compostos fenólicos totais (WANG et al., 2008).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente encontrados na natureza, representados principalmente pelos flavonoides e ácidos fenólicos. O crescente interesse nestas substâncias deve-se principalmente ao seu potencial antioxidante e associação entre o consumo e a prevenção de algumas doenças (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Para otimizar o processo de extração dos fenólicos totais do LB, a concentração de etanol de 60 % (v/v), temperatura de extração de 50 °C, e proporção sólido/ líquido de 1 g/ 25 mL foram escolhidos como condição central do DCCR. O tempo de extração foi fixado em 30 minutos. Esses parâmetros foram escolhidos com base em estudos preliminares e dados encontrados na literatura (WANG et al., 2008).

A Tabela 3 mostra as condições experimentais e os resultados das extrações de acordo com o planejamento fatorial 2³. O teor máximo de compostos fenólicos (34,30 mg EAG/g de LB) foi obtido sob os parâmetros experimentais do experimento de N°14. O menor teor de compostos fenólicos (21,25 mg EAG/g de LB) foi observado para o experimento de N° 7.

Tabela 2- Delineamento composto central rotacional de cinco-nível, três-variável e uma resposta (Compostos fenólicos totais)

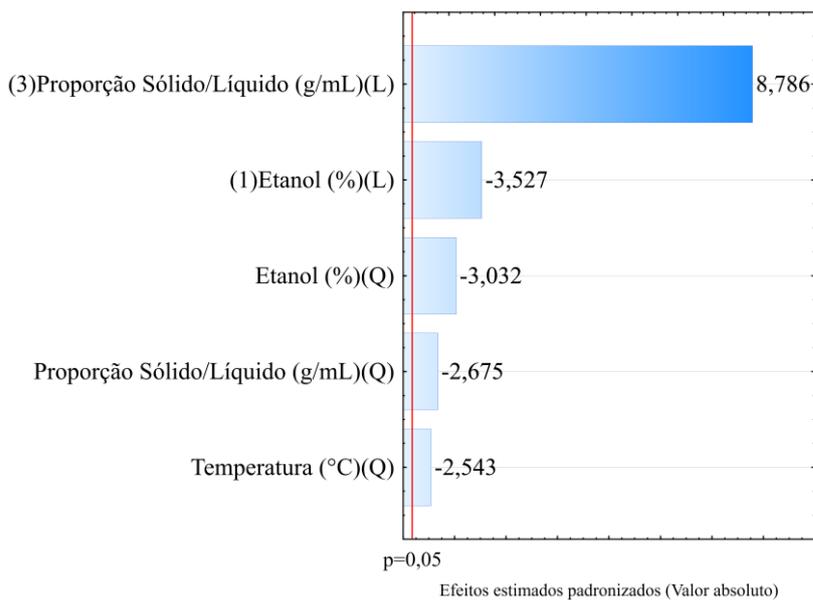
Exper.	X1 Concentração de etanol (%)	X2 Temperatura de extração (°C)	X3 Proporção Sólido/Líquido (g/X mL)	Compostos fenólicos totais*
1	50 (-1)	40 (-1)	20 (-1)	24,46 ± 0,71
2	50 (-1)	40 (-1)	30 (+1)	33,21 ± 4,46
3	50 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	25,00 ± 0,31
4	50 (-1)	60 (+1)	30 (+1)	32,52 ± 1,40
5	70 (+1)	40 (-1)	20 (-1)	24,04 ± 1,15
6	70 (+1)	40 (-1)	30 (+1)	29,61 ± 0,85
7	70 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	21,25 ± 1,93
8	70 (+1)	60 (+1)	30 (+1)	26,69 ± 2,43
9	43 (-1,68)	50 (0)	25 (0)	29,48 ± 0,59
10	77 (+1,68)	50 (0)	25 (0)	26,22 ± 1,16
11	60 (0)	33 (-1,68)	25 (0)	26,38 ± 0,86
12	60 (0)	67 (+1,68)	25 (0)	30,46 ± 2,00
13	60 (0)	50 (0)	17 (-1,68)	22,24 ± 0,44
14	60 (0)	50 (0)	33 (+1,68)	34,30 ± 0,75
15	60 (0)	50 (0)	25 (0)	30,05 ± 2,20
16	60 (0)	50 (0)	25 (0)	30,92 ± 0,33
17	60 (0)	50 (0)	25 (0)	31,20 ± 0,05
18	60 (0)	50 (0)	25 (0)	31,10 ± 0,36

*Expresso em mg/g EAG – Equivalente de ácido gálico.

A análise estatística revelou que a variável que apresentou maior relevância no experimento ($p < 0,001$) quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, foi a variável correspondente à proporção sólido/ líquido (Tabela 3). O que pode ser confirmado ao observar os resultados de compostos fenólicos totais no planejamento. O experimento de N°14 se destacou com os valores mais altos obtidos para o conteúdo de fenólicos totais foi (34,30 mg EAG g⁻¹ de LB) com uma concentração 60 % de etanol, temperatura de extração de 50 °C e proporção sólido/ líquido de 1 g/ 33 mL. Segundo do conjunto de variáveis N° 2 (33,21 mg EAG g⁻¹ de LB), experimento N° 4 (32,53 mg EAG g⁻¹ de LB).

Foi observado também um maior teor de fenóis a partir do conjunto de dados do experimento de N° 14 (ponto axial + para proporção sólido/líquido), em comparação com o conjunto de dados do ensaio N° 13 (ponto axial - para proporção sólido/líquido), esses valores sugerem que o aumento da proporção sólido/líquido e a diminuição da concentração de etanol foi mais favorável à extração de compostos fenólicos. Essa tendência pode ser observada também no gráfico de Pareto (Figura 1).

Figura 1- Gráfico de Pareto para a extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB) - DCCR ($R^2= 0,92841$).



O Figura 1 demonstra que as variáveis com maior efeito significativo foram a proporção sólido líquido, com efeito positivo, ou seja, quanto maior quantidade de solução extratora maior a concentração de CFT, já a concentração de etanol teve um efeito negativo, quanto menor a proporção de etanol na solução extratora maior o teor de CFT.

Tabela 3 - Coeficientes de regressão do modelo polinomial para a extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB)^a

Variáveis	Coeficiente estimado	Erro padrão	Valor t	Valor p
b ₀	30,86776	0,751050	41,09	<0,0001
b ₁	-2,79709	0,814126	-3,43	0,0088
b ₃	6,96685	0,814126	8,55	<0,0001
b ₁₁	-2,49815	0,845933	-2,95	0,0183
b ₂₂	-2,09563	0,845933	-2,47	0,0382
b ₃₃	-2,20433	0,845933	-2,60	0,0313

^a Foram incluídas apenas variáveis com p < 0,05.

A análise de regressão múltipla foi realizada nos dados experimentais e os coeficientes do modelo foram avaliados quanto à significância com o teste t de *Student*. Dentre os coeficientes lineares apenas o da temperatura de extração não foi significativo (p > 0,05), desta forma eliminado da equação, os demais coeficientes lineares foram significativos (p < 0,05). Todos os coeficientes de interação foram eliminados na equação, pois seus efeitos não foram significativos (p > 0,05). Os valores dos coeficientes são apresentados na Tabela 3. O coeficiente de determinação (R²) do modelo foi 0,9284, indicando que o modelo representou adequadamente a relação real entre os parâmetros escolhidos. Desprezando os termos não significativos, a equação preditiva final obtida é a seguinte (Equação 3):

$$Y = 30,86776 - 2,79709x_1 + 6,96685x_3 - 2,49815x_1^2 - 2,09563x_2^2 - 2,20433x_3^2 \quad (3)$$

Para determinar níveis ótimos das variáveis para a extração de compostos fenólicos do lúpulo brasileiro (LB), foram construídos gráficos tridimensionais de superfície de resposta para a Equação 3. A Figura 2 (a) mostra o efeito da concentração de etanol e temperatura na extração para o teor de compostos fenólicos. O conteúdo fenólico total aumentou com a diminuição da concentração de etanol a uma dada temperatura de extração e quase alcançou um pico de extração na menor concentração de etanol testada. De acordo com alguns autores o solvente utilizado na extração é um fator determinante para a eficácia do processo de extração de compostos fenólicos e flavonoides, os mesmos relatam que a mistura de álcool etílico e água para a extração destes compostos presentes em matrizes sólidas, torna-se uma ótima opção, pois a presença da água aumenta a permeabilidade do tecido celular, e assim auxiliar na transferência

de massa por difusão molecular, bem como na recuperação dos compostos bioativos solúveis em água. A utilização de solventes com diferentes polaridades também possibilita a extração de compostos polares (água) ou apolares (álcool etílico). Desta forma, ao utilizar uma solução extratora hidroalcoólica é possível extrair tanto compostos mais polares quanto os menos polares, significando vantagem na extração (SALDANHA, 2005; CHAICOUSKI et al., 2014). Para a temperatura, quando aumentada em uma concentração fixa de etanol, ocorreu um pequeno aumento no teor fenólico total, atingindo um máximo na temperatura de extração próxima ao ponto central.

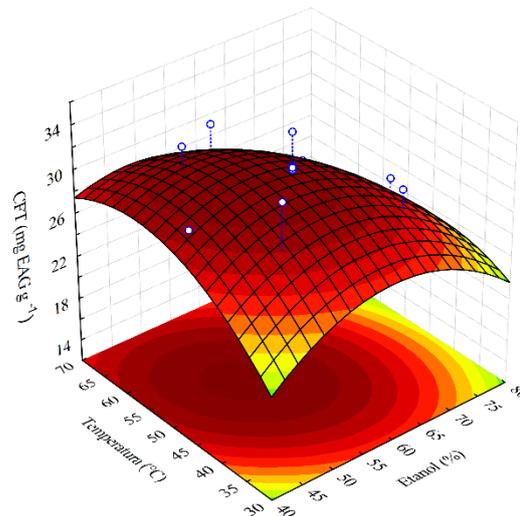
Figura 2-

a - Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de etanol (%) e temperatura de extração (°C) sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A proporção de sólido/ líquido de extração é constante ao nível zero, 1 g/ 25 mL;

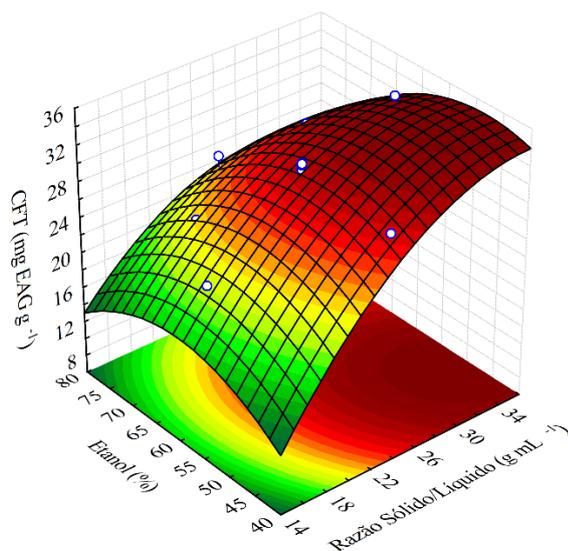
b - Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de etanol (%) e proporção de sólido/líquido sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A temperatura de extração (°C) é constante ao nível zero, 50 °C;

c - Gráfico de superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura de extração (°C) em relação a proporção de sólido/líquido sobre o teor de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). A concentração de etanol (%) é constante ao nível zero, 60 %

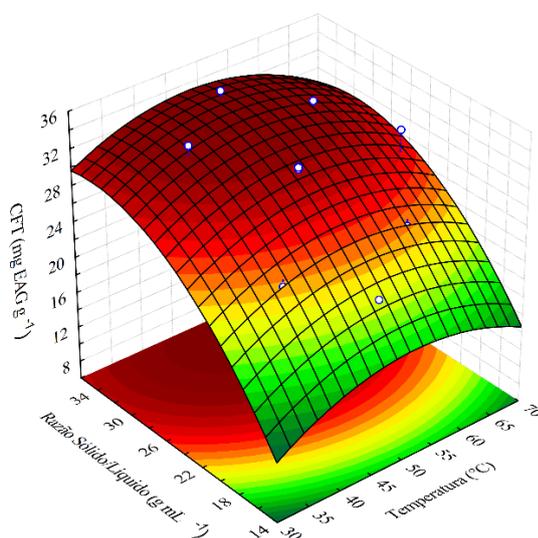
(a)



(b)



(c)



O efeito da concentração de etanol e da proporção de sólido/ líquido estão expostos na Figura 2 (b). A figura demonstra que o total de compostos fenólicos, aumentou significativamente com o aumento do volume de solução extratora e em menores concentrações de etanol, próximo a 50%, extraíndo assim todas as classes de fenólicos, polares e apolares, utilizando uma temperatura fixa de extração de 50 °C. A Figura 2 (c) reflete o efeito da temperatura de extração e proporção sólido/líquido na extração de compostos fenólicos totais do lúpulo brasileiro (LB). Revelando que ocorreu um aumento de fenólicos com a temperatura de extração próxima ao ponto central e a maior proporção sólido/líquido avaliada, para uma concentração de etanol fixa de 60 %.

As condições ótimas foram determinadas através da análise estatística (STATISTICA 7.0), sendo essas as seguintes: concentração de etanol, 49 %; temperatura de extração, 52 °C; e a proporção de sólido/ líquido de 1 g para 34 mL de solução extratora em um tempo de extração

fixo de 30 min (Tabela 4). A melhor resposta testada no planejamento foi de 34,30 mg EAG/g de lúpulo brasileiro (LB). Para obter o melhor resultado foi realizada a extração utilizando os pontos ótimos, gerando um valor médio de $33,93 \pm 0,67$ mg GAE/g de lúpulo brasileiro (LB) ($n = 3$). A relação entre os valores dos experimentos encontrados e os preditos pelo modelo, mostraram que as condições ótimas obtidas refletir a realidade dentre os parâmetros testados.

Tabela 4 - Valores ótimos para as três variáveis testadas no delineamento composto central rotacional.

Variáveis	Valores
Concentração de etanol (%)	49
Temperatura de extração (°C)	52
Proporção sólido/ líquido (g/ X mL)	34

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

O maior grupo de compostos bioativos é representado pelos compostos fenólicos, do qual, os flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavonóis, entre outros), ácidos fenólicos, estilbenos e taninos são classificados como subgrupos. Para quantificação do teor de flavonoides totais em frutas e vegetais, o método mais utilizado baseia-se na determinação espectrofotométrica do complexo formado entre os flavonoides da matriz e cloreto de alumínio ($AlCl_3$). No presente estudo, foi avaliado o teor de flavonoides total para as amostras com base no complexo formado, flavonoide- $AlCl_3$ (FERNANDES et al., 2012).

Foram utilizados os pontos ótimos determinados pelo planejamento (DCCR), ou seja, mistura dos solventes, álcool etílico e água, na concentração 49:51 (v/v), respectivamente, temperatura de extração de 52 °C e proporção sólido: líquido de 1:34 (m/v). Os resultados do processo de extração dos compostos fenólicos totais (CFT) e teor de flavonoides totais (TFT) para os lúpulos LB e LU, podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise de compostos bioativos.

Análises	LB	LU
Compostos fenólicos*	33,93 ± 0,67 ^a	27,31 ± 0,98 ^b
Flavonoides**	54,47 ± 0,10 ^a	52,94 ± 0,69 ^b

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

*Expresso em mg EAG (Equivalente de ácido gálico) g⁻¹, ** Expresso em mg EQ (Equivalente de quercetina) g⁻¹.

Ao observar os resultados obtidos para a análise de flavonoides na Tabela 5 é possível afirmar que houve diferença estatística entre a amostra de lúpulo LB e LU ao nível de 95 % de significância. O lúpulo LB apresentou o maior teor de flavonoides em base seca, seguido da amostra. O mesmo ocorreu para o teor de CFT nos extratos que apresentaram diferença significativa entre os lúpulos cultivados em lugares diferentes.

O fato da concentração de CFT ser menor que o TFT, deve-se aos métodos utilizados que são diferentes e as curvas padrões equivalentes, visto que para TFT o padrão equivalente utilizado é a quercetina um dos compostos quantificados como majoritário nos lúpulos estudados.

A diferença entre os resultados para a análise de teor de CFT e flavonoides, dos lúpulos produzidos em países diferentes deve-se provavelmente às condições climáticas e composição do solo onde foram cultivadas. Deve-se levar em consideração também o fato da amostra LB ter sido coletada *in natura*, e preparada laboratorialmente para as análises, já a amostra LU é uma amostra comercial, desta forma os parâmetros de preparo das amostras foram diferentes, podendo influenciar no teor de compostos bioativos presentes nas mesmas.

Estudo conduzido por Wang et al., (2014) com cones de lúpulo da variedade Tsingdao coletada do município de Yumen, na província de Gansu na China, relatou uma alta quantidade de compostos fenólicos (CF = 887 mg CFs/g de lúpulo) no extrato de lúpulo. O alto teor de CF relatado neste estudo deve-se ao processo de preparação da amostra, à variedade e à região de crescimento, além da análise de determinação ter sido realizada por HPLC, uma técnica mais sensível.

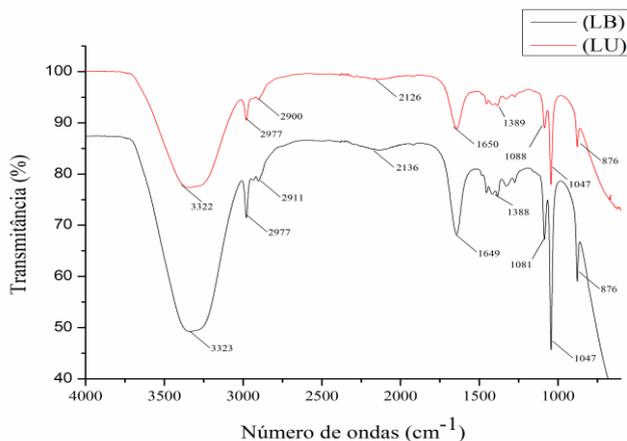
Kahkonen et al. (1999), utilizando um método de extração semelhante ao presente trabalho, relataram CFT de 23 ± 08 mg EAG g⁻¹ de lúpulo, embora a variedade de lúpulo não tenha sido mencionada.

Kowalczyk et al. (2013) relataram valores para variedades de lúpulo Magnum e Marynka de CFT entre $44,22 \pm 3,48$ a $73,49 \pm 4,03$ mg EAG g^{-1} de lúpulo e de TFT entre $5,86 \pm 0,59$ a $16,54 \pm 0,63$ mg EQ g^{-1} de lúpulo. A concentração de flavonoides totais observada no presente estudo para LB foi superior aos valores reportados por Kowalczyk et al. (2013) e observados para LU, demonstrando que o lúpulo brasileiro é tão rico em flavonoides quanto a variedade de lúpulo em Cascade dos EUA.

3.3 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os espectros no infravermelho dos extratos de lúpulo são mostrados na Figura 3, utilizando uma relação entre a transmitância de radiação pelo número de onda. O espectro do LB é claramente semelhante ao do LU.

Figura 3- Espectros FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) dos extratos de lúpulo brasileiro (LB) e dos EUA (LU)



Ambos os espectros, LB e LU, contém uma banda de absorção entre 3100 e 3500 cm^{-1} , o que corresponde à vibração dos grupamentos O-H atribuídos à presença de fenóis que formaram ligações de hidrogênio (formação de dímeros e poli associados) ou dos solventes da extração, álcool etílico e água (SCHULZ e BARANSKA, 2007). O espectro mostra duas faixas de absorção entre 2850 e 3000 cm^{-1} que correspondem às ligações de C-H dos compostos com presença dos grupos CH_2 e CH_3 (LU set al., 2011; SCHULZ e BARANSKA, 2007). A banda de transmitância seguinte a 1650 cm^{-1} corresponde à vibração estimada dos compostos aromáticos (C-C), enquanto que as bandas de transmitância próximas a 1390 cm^{-1} podem estar

relacionadas com a presença de grupamentos C=O, clorofila e dos compostos fenólicos (SCHULZ e BARANSKA, 2007). Em 1088 e 1050 cm^{-1} , pode-se observar duas bandas referentes ao -C-O- para fenóis, enquanto a banda de 870 cm^{-1} é referente a frequência vibracional dos grupos CH_2OH de carboidratos. O número dessas bandas e suas intensidades dependem dos compostos presentes na amostra e da substituição dos anéis aromáticos (MORDECHAI et al., 2001). A presença de uma banda larga entre 3100 e 3500 cm^{-1} e as bandas dentro de 1100-1300 cm^{-1} pode indicar que as amostras possuem o grupo carboxílico presente em compostos de fenólicos (CESLOVÁ et al., 2009). Pode-se observar também que a intensidade das bandas características da presença de compostos fenólicos são diferentes para as amostras, podendo estar relacionado com o maior teor de CFT identificado em LB.

A partir dos espectros FTIR das amostras de extratos dos lúpulos testados, sugere-se que os extrato LB contém os mesmos compostos que o LU, pois apresentaram espectros de transmitância muito semelhantes. As amostras contém derivados de flavonoides e compostos fenólicos. Estes derivados podem incluir xantohumol (XH), isoxantohumol (IXH) e outros derivados (CESLOVÁ et al., 2009). Com base em estudo semelhante realizado por Masek et al., (2014) com extrato de lúpulo obtido por extração com fluido supercrítico, observou-se que os perfis de absorção no espectro FTIR dos extratos do presente trabalho, apresentam conformidade com os dados relatados na literatura.

3.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO LÚPULO POR LC/ESI MS/MS

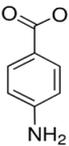
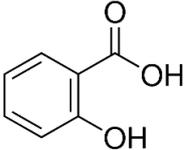
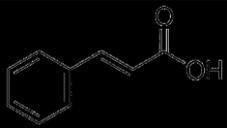
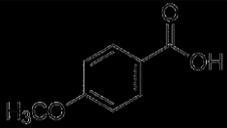
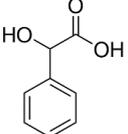
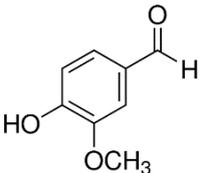
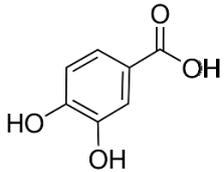
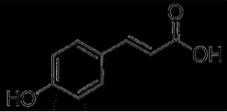
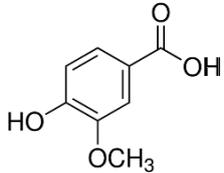
A Tabela 6 mostra a identificação e quantificação dos compostos fenólicos encontrados nos extratos hidroalcoólicos dos lúpulos líquido e seco. Foram identificados na fase líquida dos extratos 15 compostos em LUL e 16 em LBL e entre estes 11 foram quantificados em ambas as amostras. Na fase seca dos extratos 18 compostos fenólicos foram identificados e 12 foram quantificados LUS. Por outro lado, 20 compostos foram identificados e 14 foram quantificados em LBS.

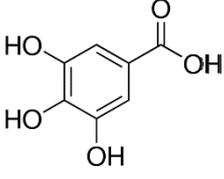
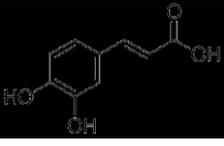
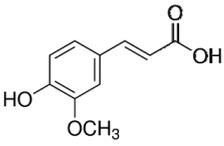
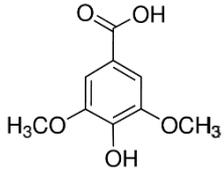
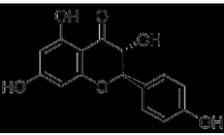
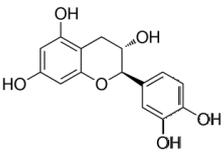
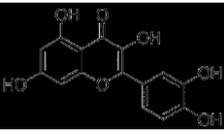
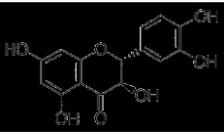
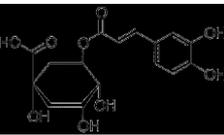
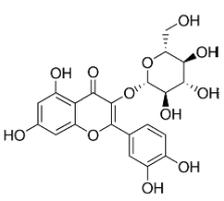
Os principais compostos fenólicos encontrados em todos os extratos foram isoquercetina seguida de quercetina. As fases líquida e seca dos extratos apresentaram composições semelhantes, entretanto, os extratos de lúpulo brasileiro (LB) apresentaram alguns compostos fenólicos que não foram observados no lúpulo dos EUA (LU), como o ácido cinâmico e o ácido ρ -anísico. Além disso, o lúpulo brasileiro apresentou maior concentração para a maioria dos compostos identificados.

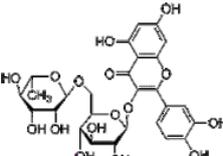
Quercetina, canferol e catequina em extratos de lúpulo da variedade Galena foram encontrados em estudos realizados por Aron e et al., (2012). Por outro lado, Farag et al., (2012) relataram rutina, isoquercetina, malonato de isoquercetina, astragalina, malonato de astragalina, entre outros flavonoides para o extrato de lúpulo da variedade Hallertau Hallertauer Tradition, da Alemanha.

Jelínek et al. (2014) relataram compostos de catequina, epicatequina e ácido ferúlico para o lúpulo da variedade Vital e Saaz. Os mesmos autores identificaram ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, rutina, ácido elágico, quercetina, ácido gálico, catequina, ácido siríngico, epicatequina, cumarina, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-cinâmico, naringenina, ácido gentísico, ácido cafeico, e ácido ferúlico para as variedades Agnus, Bor, Harmonie, Premiant, Rubín, Sládek e Saaz da República Checa (JELÍNEK et al., 2010). No presente trabalho a maioria destes compostos também foram encontrados no lúpulo da variedade Cascade e esta é a primeira vez que estes são relatados na literatura, LB e LU (Tabela 6).

Tabela 6- Perfil fenólico de extratos líquidos e secos de lúpulo da variedade Cascade produzidos no Brasil (LBL / LBS) e nos EUA (LUL / LUS) da forma líquida e seca respectivamente

Compostos Fenólicos	Estrutura química	LUL (mg 100 mL ⁻¹)	LBL (mg 100 mL ⁻¹)	LUS (mg 100 g ⁻¹)	LBS (mg 100 g ⁻¹)
Ácido 4-aminobenzóico		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido salicílico		0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,27 ± 0,00
Ácido cinâmico		-	-	-	<LOQ
Ácido p-anísico		-	<LOQ	-	<LOQ
Ácido mandélico		-	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Vanilina		-	-	<LOQ	0,11 ± 0,01
Ácido Protocatecuico		0,10 ± 0,00	0,27 ± 0,02	0,92 ± 0,01	1,46 ± 0,09
Ácido p-cumárico		0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,48 ± 0,06	0,53 ± 0,06
Ácido vanílico		<LOQ	0,17 ± 0,07	0,56 ± 0,07	1,32 ± 0,10

Ácido gálico		$0,01 \pm 0,00$	-	$0,89 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$
Ácido cafeico		-	-	<LOQ	$0,03 \pm 0,00$
Ácido. ferúlico		$0,12 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,01$	$3,84 \pm 1,98$	$5,07 \pm 2,13$
Ácido siríngico		$0,09 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,11$
Aromadendrin		$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Catequina		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Quercetina		$2,38 \pm 0,20$	$8,24 \pm 0,56$	$2,63 \pm 0,60$	$16,56 \pm 2,01$
Taxifolina		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ácido Clorogênico		$0,11 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,17$	$0,39 \pm 0,02$
Isoquercetina		$10,28 \pm 0,10$	$30,64 \pm 2,16$	$49,02 \pm 2,11$	$97,17 \pm 4,58$

Rutina		$0,12 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,17$	$0,33 \pm 0,02$
--------	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

LOQ = limite de quantificação

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH• E ABTS•⁺)

A capacidade antioxidante de LB e LU avaliadas pelos métodos DPPH• e ABTS•⁺ apresentou diferença estatística em ambos os testes. Os valores de EC₅₀ utilizando ABTS•⁺ foram $21,29 \pm 1,36 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $23,65 \pm 0,52 \mu\text{L mL}^{-1}$ para LB e LU, respectivamente, enquanto foram de $3,91 \pm 0,17 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $5,79 \pm 0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, para DPPH•. A amostra de LB apresentou maior atividade antioxidante quando comparada à LU. Isso pode estar relacionado ao maior conteúdo de CFT e TFT encontrados em LB, uma vez que esses compostos possuem uma atividade antioxidante conhecida. Além disso, deve-se notar que LB é uma amostra *in natura* e LU na forma de *pellets*.

Kowalczyk et al. (2013) relataram que durante o processamento para a produção de *pellets* os lúpulos são expostos a temperaturas superiores a 55 °C e ao ar. Nestas condições, alguns compostos fenólicos podem ser degradados. No entanto, alguns estudos indicaram que o processo de peletização não teve efeito significativo sobre a ação antioxidante (KOWALCZYK et al., 2013; KROFTA et al., 2008). Portanto, é provável que a diferença relacionada no presente estudo se deva principalmente ao local de cultivo e não ao processamento das amostras.

A atividade antioxidante de extratos de panta está relacionada aos compostos presentes e com sua estrutura fenólica. Os ácidos fenólicos, flavonoides e uma variedade de outros compostos polifenólicos, com um ou mais grupos hidroxila conjugados a um grupo hidrocarboneto aromático, fornece sua atividade antioxidante, que pode ser maior ou menor dependendo da posição e número de grupos hidroxila (SCHROETER et al., 2002). A atividade antioxidante *in vitro* do lúpulo da variedade Cascade ainda não foi relatada na literatura. A alta atividade antioxidante encontrada nos extratos de lúpulo (LB e LU) neste estudo deve-se à presença de grande quantidade de compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) identificados nos extratos de lúpulo. Isoquercetina e quercetina foram os principais compostos flavonoides observados nos extratos, que são conhecidos por seu alto poder antioxidante (KARABIN et al., 2015; SCHROETER et al., 2002).

Os flavonoides quercetina e isoquercetina, compostos majoritários determinados nas amostras deste estudo, possuem estrutura com múltiplas hidroxilas e ramificações, ideais para sequestro de radicais, tendo assim uma ação antioxidante efetiva detectada pelos testes DPPH• e ABTS•⁺ (VONGSAK et al., 2013; HAMINIUK et al., 2012; HARBORNE, 1979). Tem sido relatado que compostos fenólicos (ácido salicílico, ácido protocatecuico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido clorogênico) e flavonoides, como catequina, proantocianidinas, flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina, rutina), flavanonas (naringenina), flavonoides glicosilados e prenilflavonóis (xantumol), encontrados no lúpulo, têm estrutura química que favorece diretamente a atividade antioxidante em uma ampla variedade de amostras de lúpulo (MONGELLI et al., 2016; KARABIN et al., 2015; MASEK et al., 2014; TRONINA et al., 2013; CESLOVA et al., 2009).

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS DE LÚPULO

Os extratos LB e LU não apresentaram atividade inibitória contra as bactérias Gram-negativas *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*. Porém, ambas as amostras apresentaram capacidade de inibir o crescimento dos micro-organismos patogênicos Gram-positivos *S. aureus* e *B. cereus*, na menor concentração avaliada ($100 \mu\text{L mL}^{-1}$) e para o *P. mirabilis* Gram-negativo, a CIM foi de $300 \mu\text{L mL}^{-1}$, sendo essas bactérias de importância em alimentos, devendo ser prevenida a sua contaminação e crescimento.

Teuber e Schmalreck (1973) demonstraram que a região lipofílica da membrana celular representa o local alvo para ação antibacteriana de compostos de lúpulo, tais como prenilflavonóides, flavonoides, humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos). Conseqüentemente, as propriedades antibióticas mostraram-se dependentes principalmente das partes hidrofóbicas das moléculas, demonstrando assim a maior atividade dos compostos do lúpulo para bactérias Gram positivas que possuem parede celular mais lipofílica (SILVA; FARIA, 2008; GERHAUSER, 2005; TEUBER; SCHMALRECK, 1973).

Trabalhos anteriores atribuíram a atividade antimicrobiana aos compostos de ocorrência natural no lúpulo, como os humulones (α -ácidos) e lupulones (β -ácidos) contra bactérias Gram-positivas. Assim, a atividade antimicrobiana observada neste estudo pode estar associada a estes compostos além de compostos fenólicos e flavonoides, que podem fornecer uma ação sinérgica ou aditiva contra os microrganismos testados (Gerhäuser, 2005; Zanolli & Zavatti, 2008; Karabin et al., 2015).

Tem sido relatado o potencial de muitos flavonoides presentes no lúpulo para a inibição de microrganismos patogênicos, como o *Staphylococcus aureus*. Mizobuchi e Sato (1984) investigaram o potencial de vários flavonoides do lúpulo para inibir o crescimento de *S. aureus*, um patógeno Gram-positivo, em comparação com *E. coli*, um patógeno Gram-negativo, relatando a inibição de *S. aureus* para xantumol (prenilflavonols) e 6-prenilnaringenin (CIM de 17,7 μM e 18,4 μM , respectivamente), ao passo que nenhum dos compostos inibiu a *E. coli*. Xu; Lee (2001) relataram que a miricetina, presente no lúpulo, inibiu o crescimento das bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* e *Burkholderia cepacia* (forma MIC de 64 a 256 mg mL^{-1}).

4. CONCLUSÃO

O DCCR mostrou-se uma ferramenta útil para obter as condições ótimas para a extração de CFT de *Humulus lupulus* L. cultivado no Brasil. Os resultados obtidos na análise de CFT, TFT e atividade antioxidante *in vitro* mostraram que as amostras de lúpulo cultivadas no Brasil são diferentes das produzidas nos EUA, com destaque para a amostra de LB, que apresentou maior teor de compostos bioativos (CFT e TFT) e capacidade maior antioxidante. Isoquercetina e quercetina foram os principais compostos fenólicos em todos os extratos de lúpulo estudados. Os extratos de lúpulo foram eficientes na inibição de *S. aureus*, *B. cereus* e *P. mirabilis*. Esta ação pode estar relacionada aos lupulones e humulones, bem como aos flavonoides presentes no lúpulo, sugerindo estudos para observar o efeito sinérgico ou aditivo desses compostos. Portanto, extratos de lúpulo brasileiros apresentam atividades antioxidante e antimicrobiana, possuindo potencial para a aplicação em alimentos como aditivo natural, com a finalidade de preservação oxidativa e microbiana em alimentos.

REFERÊNCIAS

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 34, p. 206–213, 2017.

ARON, P. M.; TING, P.L.; SHELLHAMMER, T. H. HPLC-ESI-MS Identification of hop-derived polyphenols that contribute antioxidant capacity and flavor to beer. In: QIAN, M. C.; SHELLHAMMER, T. H., editors. **Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages**. p. 217–234, 2012.

BLAND, J. S.; MINICH, D.; LERMAN, R.; DARLAND, G.; LAMB, J.; TRIPP, M.; GRAYSON, N. Isohumulones from hops (*Humulus lupulus*) and their potential role in medical nutrition therapy. **Pharma Nutrition**. v. 3, p. 46–52, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**; Norma Aprovada. 6º Ed. Vol. 23 Nº 2. 2003.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and practice*. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap.7.

CESLOVA, L., HOLCĀPEK, H.; FIDLER, M.; DRŠTICĀKOVA, J.; LISA, M. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.7249–7257, 2009.

CHANG C.; YANG M.; WEN H.; CHERN J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.10, p.178-182, 2002.

CHEN, Q.; FU, M.; CHEN, M.; LIU, J.; LIU, X.; HE, G.; PU, S. Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**. v. 132, p. 619–623, 2012.

CHEN, W.; WANG, W.P.; ZHANG, H.S.; HUANG, Q. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, p. 614–619, 2012.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.16, p.33-41, 2014.

CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário, 2016. Disponível:http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016_WEB.pdf. Acesso em: 15/06/2018.

FARAG M. A.; PORZEL A.; SCHMIDT J.; WESSJOHANN L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Journal Metabolomics**. V.8, p.492-507, 2012.

FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA M. R. A.; RANDAU K. P.; DE SOUZA T. P.; SOARES L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**. Article ID 923462, 2012.

FUSSYA, Z.; PATZAKC, J.; STEHLIKB, J.; MATOUSEK, J. Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. **Journal of Plant Physiology**. v. 170, p. 688– 695, 2013.

GARDEA-TORRESDEY, J.; HEJAZI, M.; TIEMANN, K.; PARSONS, J.G.; DUARTE-GARDEA, M.; HENNING, J. Use of hop (*Humulus lupulus*) agricultural by-products for the reduction of aqueous lead (II) environmental health hazards. **Journal of Hazardous Materials**. v. 91, p. 95–112, 2002.

GERHAUSER C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 49, p. 827 – 831, 2005a.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**. v. 41, p. 1941–1954, 2005b.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 47, p. 2023-2044, 2012.

HARBORNE J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. *Biochemistry of Plant Phenolics*, Plenum Press, New York. p. 457-474, 1979.

JELÍNEK, L.; KARABIN, M.; KOTLIKOVA, B.; HUDCOVA, T., DOSTALEK, P. Application of a hop byproduct in brewing: reduction in the level of haze-active prolamines and improved antioxidant properties of the beer. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 120, p. 99–104. 2014.

JELÍNEK, L.; SNEBERGER, M.; KARABIN, M.; DOSTALEK, P. Comparison of Czech Hop Cultivars Based on their Contents of Secondary Metabolites. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, p. 309–316, 2010.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids, **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 1063–1090, 2015.

KAVALIER, A. R.; LITT, A.; MA, C.; PITRA, N. J.; COLES, M. C.; KENNELLY, E. J.; MATTHEWS, P. D. Phytochemical and Morphological Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Cones over Five Developmental Stages Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry, Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection, and Light Microscopy Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 4783–4793, 2011.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KOWALCZYK, D.; ŚWIECA M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103–110, 2013.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 160–166. 2008.

MAGALHÃES, P. J.; VIEIRA, J. S.; GONÇALVES, L. M.; PACHECO, J. G.; GUIDO, L. F.; BARROS, A. A. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, p. 3258–3268, 2010.

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; KOSMALSKA, A.; ZABORSKI, M. Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis. **Food Chemistry**. v.156, p.353–361, 2014.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p.127-130, 2001.

MIZOBUCHI, S.; SATO, Y. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 48, p. 2771-2775, 1985.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; CALIGIANI, A.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Are *Humulus lupulus* L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A phytochemical approach. **Industrial Crops and Products**. v. 83, p. 693–700, 2016.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**. v. 70, p. 16–27, 2015.

MORDECHAI, S.; MORDECHAI, J.; RAMESH, J.; LEVI, C.; HULEIHEL, M.; ERUKHIMOVITCH, V. Application of FTIR microspectroscopy for the follow-up of childhood leukaemia chemotherapy. **Proceedings of SPIE Subsurface and Surface Sensing Technologies and Applications III**. v. 4491, p. 243–250, 2001.

ROBERTS, T.R., e WILSON, R.J.H., 2006. Hops. In G. G. S. FERGUS G. PRIEST (Ed.), *Handbook of Brewing* (2nd ed., pp. 177–281). Boca Raton: Taylor & Francis. Schroeter, H. and Boyd, C.

ROSSI JUNIOR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SALDANHA, D. A. Avaliação da atividade antioxidante “in vitro” de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). Dissertação (Mestre em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p.13–25, 2007.

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; DE GOIS, J. S.; DE ALMEIDA, T. S.; VITALI, L.; SPUDEIT, D. A.; MICKE, G. A.; BORGES, D. L. G.; FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**. v. 77, p. 125-131, 2015.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; WILLIAMS, R. J., CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**. v. 23, p. 861–880, 2002.

SILVA, P. H A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 902-906, 2008.

TEUBER, M.; SCHMALRECK, A. F. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. **Archives of Microbiology**. v. 94, p. 159-171, 1973.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, p.669-675, 2006.

TIWARI B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. Trends in *Analytical Chemistry*. v.71, p. 100–109, 2015.

TRONINA, T.; BARTMANSKA, A.; MILCZAREK, M.; WIETRZYK, J.; POPŁONSKI, J.; RÓJ, E.; HUSZCZA, E. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, p. 1957–1960, 2013.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**. v. 44, p. 566–571. 2013.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**. v. 106 p. 804–810, 2008.

WANG, X.; YANG, L.; YANG X.; TIAN Y. *In vitro* and *in vivo* antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 94, p. 1693–1700. 2014.

XU, H. X.; LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 39–43, 2001.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 383–396, 2008.

**CAPÍTULO 3: Caracterização do lúpulo (*Humulus lupulus* L. var. Cascade)
produzido no Brasil e nos EUA usando GC / MS e LC-ESI-MS / MS**

RESUMO

Este estudo apresenta uma avaliação abrangente para os lúpulos (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil (LB) e EUA (LU) da variedade Cascade. A composição físico-química e o perfil fenólico por LC-ESI-MS / MS do LB e LU foram determinados. A caracterização química dos óleos essenciais do lúpulo brasileiro (OLB) e americano (OLU) por GC MS / MS, e a atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do OLB e OLU e os extratos de lúpulo (ELB e ELU), também foram estudados. Os compostos fenólicos quantificados em LB e LU foram ácido protocatecuico ($11,39 \pm 1,04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e $4,18 \pm 0,17 \text{ mg } 100^{-1}$), isoquercitrina ($4,90 \pm 0,28 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $2,44 \pm 0,16 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), e ácido ferúlico ($4,48 \pm 0,08 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e $1,45 \pm 0,62 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) para LB e LU, respectivamente. O trans- β -farneseno (20,60%), β -selineno (18,78%), mirceno (16,57%) e α -selineno (16,22%) foram os principais compostos encontrados no óleo essencial de LB (OLB). Por outro lado, α -humuleno (35,35%), mirceno (22,35%), β -cariofileno (12,81%) e trans- β -farneseno (10,59%) foram os principais compostos encontrados no óleo essencial da LU (OLU). Os extratos de ELB e ELU apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados ao OLB e OLU. As amostras apresentaram composição físico-química semelhante ao relatado na literatura e boa eficiente eliminação de radicais livres, provavelmente por ser uma fonte rica de compostos bioativos, principalmente de ácido protocatecúico, isoquercitrina e ácido ferúlico, conhecidos pela sua ação antioxidante. Assim, podendo melhorar a qualidade de outros produtos alimentares além da cerveja.

Palavras-chave: Composição; Lúpulo brasileiro; Óleo essencial; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos.

ABSTRACT

This study presents a comprehensive evaluation for hop (*Humulus lupulus*) produced in Brazil (BH) and USA (UH) of Cascade variety. The physicochemical composition and phenolic profile by LC-ESI-MS/MS of the BH and UH were determined. The chemical characterization of the essential oils of the Brazilian (BHO) and American (UHO) hops by GC MS/MS, and the antioxidant activity (DPPH and ABTS) of the BHO and UHO and the extracts of hops (BHE and UHE), were also studied. The phenolic compounds quantified in BH and UH were protocatechuic acid ($11.39 \pm 1.04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ and $4.18 \pm 0.17 \text{ mg } 100^{-1}$), isoquercitrin ($4.90 \pm 0.28 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ and $2.44 \pm 0.16 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), and ferulic acid ($4.48 \pm 0.08 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ and $1.45 \pm 0.62 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) for BH and UH, respectively. The trans- β -farnesene (20.60%), β -selinene (18.78%), mirceno (16.57%) and α -selinene (16.22%) were the main compounds found in the BH essential oil (BHO). On the other hand, α -humulene (35.35%), mirceno (22.35%), β -cariofileno (12.81%) and trans- β -farnesene (10.59%) were the major compounds found in UH essential oil (UHO). The BHE extracts and UHE showed higher antioxidant activity when compared to BHO and UHO. The samples showed are good physicochemical composition and a efficient radical scavenging, probably for being a rich source of bioactive compounds, mainly of protocatechuic acid, isoquercitrin and ferulic acid known for antioxidant action. Thus mayenhance the quality of beer and other products foodstuffs.

Keywords: Composition; Brazilian hops; Essential oils; Antioxidant Activity; Phenolic Compounds.

1. INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é amplamente utilizado na indústria da cerveja em todo o mundo para dar amargor e aroma, contribuindo também para a vida útil da cerveja. O principal uso para a produção de lúpulo mundial é para fabricação de cerveja (98%), mas o uso da planta em medicamentos, como para alívio de sintomas leves de estresse mental, insônia e tratamento para irritabilidade, perturbações do humor (inquietação, ansiedade) e distúrbios do sono, tem crescido (KOWALCZYK et al., 2013; ZANOLI; ZAVATTI, 2008). As glândulas de lupulina são as principais responsáveis pelas características do lúpulo e são produzidas apenas por inflorescências femininas (MONGELLI et al., 2015; KAVALIER et al., 2011; ZANOLI; ZAVATTI, 2008).

O crescimento adequado do lúpulo depende da localização da cultivo e das condições climáticas. O lúpulo é uma cultura de climas frios e os maiores produtores são EUA, França e Alemanha que estão localizados no hemisfério norte. No Brasil, como o clima é bastante desfavorável para o cultivo do lúpulo, é necessário importar o produto da Europa e EUA (PRIEST & STEWART, 2006; ROBERTS, e WILSON, 2006). Muitas variedades diferentes de lúpulo *H. lupulus* são usadas pelas cervejarias por causa de suas características aromáticas únicas. A variedade Cascade foi desenvolvida no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 1956, foi liberada para cultivo em 1971 e tem sido usada comercialmente desde 1976 (Mongelli et al. 2015). O relatório estatístico Hop Growers of America informa que em 2017 a produção de lúpulo da Cascade nos EUA foi de 6180 toneladas.

Algumas tentativas de produzir lúpulo no Brasil foram feitas recentemente. Embora a maioria das iniciativas para o cultivo de lúpulo no Brasil não tenha alcançado bons resultados, foi bem sucedida, no município de São Bento do Sapucaí (São Paulo, Brasil). O “lúpulo Mantiqueira”, que é uma referência à Serra da Mantiqueira, região onde foi cultivado pela primeira vez, foi produzido na “Frutopia farm”. Cerca de 2000 kg de lúpulo da variedade Cascade foram produzidos através deste projeto pioneiro em 2016. A produção atual de acordo com o produtor é de cerca de 8000 kg por ano, provenientes de 950 plantas. O planta brasileira é toda destinada à cervejaria Baden, ainda em flor, que produz o Baden Märzen, um tipo de cerveja originária da Bavária que é considerada especial por ser produzida com lúpulo 100% brasileiro. Essa iniciativa é inovadora, tem a perspectiva de incentivar a produção de lúpulo no Brasil, já que até então todos os lúpulos utilizados no Brasil eram importados na forma de *pellets*.

Os lúpulos são ricos em compostos fenólicos como catequina, epicatequina, ácido ferúlico, ácido protocatecólico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido gálico, *p*-cumárico, ácido *trans*-cinâmico, ácido gentísico, ácido gálico e ácido elágico, rutina, morina, quercetina, ácido siríngico, cumarina, naringenina e prenilflavonóides (por exemplo, xanthohumol) (FARAG; PORZET, 2012; KAVALIER et al., 2011; ZANOLI; ZAVATTI, 2008; MONGELLI et al., 2015; JELÍNEK ET AL., 2014; ARON et al 2012). Jelínek et al., (2010) relata que o lúpulo é rico em terpenos proveniente dos óleos essenciais, como mirceno, α -humuleno, *trans*- β -farneseno e β -cariofileno (MONGELLI et al., 2015; MONGELLI et al., 2016; FARAG; PORZET, 2012). A alta concentração de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, é responsável por uma alta atividade antioxidante relatada na literatura para o lúpulo. Estes compostos têm efeitos benéficos na saúde humana e na prevenção de doenças (FARAG; PORZET, 2012).

Embora o lúpulo seja uma matriz bem estudada, a sua ampla variedade torna difícil a caracterização sistemática de todas as variedades, não sendo encontradas na literatura informações detalhadas sobre a composição química do lúpulo em Cascade produzido no Brasil e nos EUA, apenas a composição do óleo essencial produzido nos EUA para esta variedade é relatado.

Assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o lúpulo produzido no Brasil (LB) e o comercial produzido nos EUA (LU) da variedade Cascade, através das análises de composição físico-química por métodos clássicos, identificação e quantificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS, extrair por arraste de vapor dos óleos essenciais do lúpulo brasileiro (OLB) e dos EUA (OLU), determinar a composição química dos óleos essenciais por CG MS/MS e obter a atividade antioxidante para todas as amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade e de origem brasileira (LB), utilizado neste estudo, foi gentilmente doado pela empresa Brasil Kirin (Itu, São Paulo).

As amostras foram cultivadas entre os meses de outubro de 2015 e abril de 2016 na cidade de São Bento do Sapucaí, São Paulo, Brasil, com localização geográfica de coordenadas 22°37'32.3"S 45°34'54.0"W, colhida na primeira semana de abril de 2016. As amostras de lúpulo foram armazenadas a vácuo, à -20 °C e ao abrigo da luz, até o envio para o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC), Florianópolis – SC. As amostras recebidas foram liofilizadas (JJ Científica, modelo LJJ02, Brasil) a -52 °C e 0,381 mmHg de vácuo por 24 horas e em seguida triturada em moinho de facas (Quimis, modelo Q298A21, Brasil) e armazenadas em embalagem de polietileno, ao abrigo da luz a -20 °C, até a realização dos experimentos.

A amostra de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade proveniente dos EUA (LU), foi gentilmente cedida pela empresa de insumos para produção de cervejas Brewtime (São José dos Campos, São Paulo) e armazenado em condições iguais da amostra de LB.

Os reagentes ABTS e DPPH utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Todos os padrões utilizados foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, EUA) e outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LÚPULOS

Para a caracterização físico-química das amostras de lúpulo LB e LU, foram realizadas as análises de determinação de umidade; proteínas por micro-Kjeldahl; cinzas; fibras brutas; teor de lipídios por extração em Soxhlet; e carboidrato por diferença, reduzindo de 100 % o teor de umidade, cinza, lipídios e proteínas. Todas as determinações foram realizadas em triplicata (AOAC, 1995; BRASIL, 2003).

2.2.1 Teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade, foram pesadas aproximadamente 5 g para cada lúpulo LB e LU. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de porcelana devidamente limpos e secos.

O procedimento foi realizado por dessecação em estufa a 105 °C, no qual as amostras foram submetidas ao aquecimento por 3 horas e após este período foram resfriadas e pesadas. As etapas de aquecimento, resfriamento e pesagem foram repetidas até peso constante e o teor de umidade foi calculado pela diferença de massa da amostra úmida e após a secagem (AOAC, 1995).

2.2.2 Cinzas totais

Para determinação de cinzas uma massa conhecida das amostras foi acondicionada em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados e em seguida submetidas à incineração em forno mufla a 550 °C por 6 horas. Após este período as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) em dessecador e em seguida foram pesadas e o teor de cinzas foi calculado, por diferença de massa (AOAC, 1995).

2.2.3 Lipídeos totais

O teor de lipídeos totais foi determinado por extração sob refluxo, em aparelho determinador de gordura Modelo TE-044-8/50 da marca Tecnal (Piracicaba – SP). O solvente utilizado foi o éter de petróleo. Os frascos do aparelho foram limpos, secos e pesados.

Foram pesados aproximadamente 2 g para cada lúpulo LB e LU previamente triturada foi acondicionada em cartucho de celulose e submetidos à extração por submersão em solvente a 90 °C. por 1 horas. Após este período os cartuchos com amostra foram elevados no equipamento e procedeu-se a extração por gotejamento por mais 30 minutos. Em seguida o solvente foi separado da mistura óleo/ solvente no próprio equipamento e após os frascos foram submetidos a secagem em estufa para total evaporação do solvente (60 °C) e logo após resfriados em dessecador e pesados para o cálculo (AOAC, 1995).

2.2.4 Proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada segundo o método de Kjeldahl clássico, seguindo as etapas: digestão, destilação e titulação. Aproximadamente 0,2 g para cada lúpulo LB e LU foi pesada em papel manteiga e transferido para o frasco de Kjeldahl junto com 10 mL de ácido sulfúrico e 2,5 g de mistura catalítica (Sulfato de cobre anidro e sulfato de sódio, na proporção 1:10).

Para a digestão as amostras foram aquecidas em bloco digestor gradativamente em capela de exaustão até atingir 400 °C e permaneceu por 4 horas, até que o conteúdo do frasco ficasse límpido e transparente (azul ou verde claro) e não fosse mais observado desprendimento de gases. Após o processo de digestão, as amostras foram resfriadas e prosseguiu com a etapa de destilação. Nesta etapa a amostra é destilada na presença de hidróxido de sódio concentrado (50 % m/v). Com a adição do hidróxido de sódio o sal amoniacal (sulfato de amônia (NH₄)₂SO₄) reage formando amônia volátil (NH₃), com o aquecimento indireto a amônia volatilizada é coletada em uma solução de ácido bórico 4 % (m/v) na presença de indicador misto (vermelho de metila + verde de bromocresol em solução alcoólica). Na etapa seguinte a amostra foi titulada com ácido clorídrico (HCl) 0,1 N. O volume gasto na titulação foi utilizado para o cálculo do teor de proteína, utilizando a Equação 3.

$$\text{Teor de proteína (\%)} = \frac{(V \times f \times F \times 0,14007)}{P} \quad (1)$$

Onde V é o volume gasto de ácido clorídrico, f é o fator de correção do ácido, F é o fator de conversão de nitrogênio para proteína (Fator 6,25) e P é a massa da amostra de lúpulo em gramas AOAC (2005).

2.2.5 Fibra bruta

Para a determinação de fibra bruta na amostra, as mesmas foram pesadas em cartucho de tecido previamente pesado e identificadas com lápis 6B. As amostras foram hidratadas por 15 minutos em água destilada para evitar a formação de “grumos”. Após, as amostras foram colocadas em 2 L de solução ácida (Ácido sulfúrico 1,25 %) e agitadas por alguns segundos e em seguida aquecidas até a fervura por 30 minutos. A solução ácida foi escoada após os 30 minutos e os cartuchos com as amostras foram lavados aquecendo em 2 L de água destilada por 5 minutos e repetindo o processo por 3 vezes. Logo em seguida as amostras foram novamente aquecidas em 2 L de solução básica (NaOH 1,25 %) até a fervura por 30 minutos. A solução,

então, foi escoada e o procedimento de lavagem com água destilada repetido por mais 3 vezes adicionando uma etapa de lavagem duas vezes com álcool absoluto (Etanol P.A) por 3 minutos e duas vezes com acetona P.A. Os cartuchos com as amostras foram bem secos em papel toalha, colocados em cadinhos de porcelana e secos em estufa a 105 °C por quatro horas, resfriados e pesados, em seguida incinerado em forno mufla por 1 hora a 550 °C, resfriado e pesado. Desta forma as fibras brutas foram determinadas pelo resíduo orgânico insolúvel da amostra, após digestão ácida e alcalina (AOAC, 1995).

2.2.6 Carboidratos

Os carboidratos foram determinados pela diferença, subtraindo de 100 % os valores das determinações do teor de umidade, cinzas, lipídios e proteínas (AOAC, 1995; BRASIL, 2003).

2.3 EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE LÚPULO

A extração foi realizada conforme otimizada no item 2.3 do Capítulo 2. Uma amostra de 1g de lúpulo (LB e LU) foi misturada (suspensa) em solução extrativa com concentração de etanol de 49% (v:v), temperatura de extração de 52 °C e relação sólido/líquido de 1g a 34 ml de solução extratora. A extração foi realizada em banho de ultrassom (Ultronique, modelo Q5.9137A, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) com volume de trabalho de 5,7 L (dimensões internas de 30x15x15 cm). A frequência e o tempo de trabalho foram fixados em 37 kHz por 30 minutos. Após a extração, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 5.000 rpm (Hermle centrífuga, modelo Z200A, Gosheim, Alemanha), o sobrenadante foi removido e filtrado com papel filtro Whatman N° 1, inerte com nitrogênio e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (6 ± 2 °C). Obtendo extratos do lúpulo brasileiro (ELB) e de lúpulo produzido no EUA (ELU).

2.4 HIDRODESTILAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração dos óleos essenciais presentes no lúpulo foi realizada em aparelho de destilação do tipo *Clevenger*. Para isso, adicionou-se 50 g de lúpulo LB e LU, em 1,5L de água destilada em balão de fundo redondo. As amostras foram aquecidas a temperatura máxima de 100 °C até atingir a ebulição durante 30 minutos, depois mantidas a 75 °C, por um período de 7 horas.

Os óleos essenciais foram coletados e armazenados em *ependorf* protegido da luz com papel alumínio, resultando, assim, na obtenção óleo essencial de lúpulo brasileiro (OLB) e de lúpulo produzidos nos EUA (OLU). Os óleos essenciais coletados foram armazenados ao abrigo da luz, e o rendimento do processo de extração foi determinado (American Society of Brewing Chemists, 1988).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A caracterização dos óleos essenciais provenientes do lúpulo LB e LU foi realizada por cromatografia gasosa acoplado com detector de espectrometria de massa (CG/MS) da marca Shimadzu, modelo GCMS - QP2010.

Para isso, foi utilizada coluna capilar ZB-5MS, 30 m x 0,25 mm x filme 0,25 µm. Temperatura de injetor foi de 250°C, fluxo de gás de arraste hélio de 1,0 mL/ min. A cromatografia foi otimizado em isoterma por 4 minutos a 60°C. A temperatura foi aumentada a uma razão de 6°C/ min a 210°C, permanecendo em isoterma por 6 minutos, totalizando 35 minutos de corrida cromatográfica. As amostras de óleos foram diluídas 200 vezes em hexano grau cromatográfico (Marca, país) para posterior injeção no CG/MS. A quantificação de cada componente foi determinada pela normalização das áreas (%) dos picos no cromatograma de íons totais (TIC, *total ions chromatogram*), sendo a área total a somatória de todas as áreas dos picos eluídos (100%).

A identificação por CG-MS foi baseada na comparação dos espectros de massas com bibliotecas de dados NIST do CG/MS, e também pela comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados – WebNIST, GMD) e em alguns casos através de comparação com padrões comerciais injetados nas mesmas condições. Os índices de retenção foram calculados segundo Van den Doll; Kratz (1963) a partir de padrões de n-alcenos (C7-C30), nas mesmas condições cromatográficas das amostras dos óleos essenciais. Os valores de índice de retenção aumentam a confiabilidade dos resultados obtidos em GC-MS, quando se utiliza a interpretação de espectros de massas e a biblioteca NIST, o que contribuiu para identificação e caracterização dos componentes individuais das amostras. A análise foi realizada na estação experimental da Epagri em Itajaí SC.

2.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E DOS EXTRATOS DE LÚPULO

2.6.1 Ensaio de inibição de radicais DPPH•

O ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizado conforme protocolo de Brand-williams et al., (1995), seguindo as modificações de Mensor et al. (2001).

Assim, a solução contendo o radical DPPH ($0,6 \text{ mmol L}^{-1}$) foi diluída com etanol até absorvância de 500 a 600 a 515 nm. Em seguida, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de amostra em $2,9 \text{ mL}$ de solução de DPPH e após 30 min a absorvância foi determinada a 115 nm em espectrofotômetro (Marca, país). O reagente Trolox foi usado como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em TEAC $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (capacidade antioxidante equivalente a $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$) e média mais ou menos o desvio padrão.

2.6.2 Ensaio de inibição de radicais ABTS•+

O ensaio ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] foi realizado de acordo com Re et al. (1999), com modificações.

Para isso, o radical ABTS (7 mmol L^{-1}) foi misturado com persulfato de potássio ($2,45 \text{ mM}$), sendo 10 mL de ABTS e 10 mL de persulfato. A solução foi homogeneizada e armazenada em frasco âmbar ao abrigo da luz por no mínimo de 16 h. A solução de ABTS foi diluída com etanol para se obter um valor de absorvância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm . Em seguida, foram adicionados $60 \mu\text{L}$ de extrato de soluções de amostra em $2,84 \text{ mL}$ de solução ABTS e após 6 min a absorvância em 734 nm foi determinada com um espectrofotômetro. O reagente Trolox foi usado como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em TEAC $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (capacidade antioxidante equivalente a $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$) e média \pm desvio padrão.

2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO LÚPULO POR HPLC-ESI-MS/MS

Para a identificação dos compostos fenólicos, as plantas de lúpulo LB e LU foram previamente preparadas e depois analisadas segundo descrito por Schulz et al., (2015), com modificações.

Primeiramente, as amostras foram desengorduradas, utilizando 1 g dos lúpulos LB e LU previamente secos por liofilização e trituradas. Assim, foram transferidas para tubos de Falcon de 50 mL, adicionadas de 25 mL de hexano e desengorduradas com auxílio de banho ultrassom (Ultronique, modelo Q5.9137A, Brasil) por 15 minutos a 25 °C, seguida de centrifugação a 4000 rpm (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha) por 15 minutos. O sobrenadante foi então removido e o resíduo submetido a uma segunda extração com hexano. A amostra desengordurada foi submetida à secagem em estufa (Tecnal, TE-395, Brasil) a 30 ± 2 °C até a remoção completa do solvente.

Em seguida as amostras desengorduradas (1g) foram adicionadas de 5 mL de metanol e 5 mL de HCl 6 mol/L, e o pH ajustado para 2 (NaOH 6 mol/L) e submetida a extração por partição com 10 mL de éter etílico. O extrato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha). O resíduo foi submetido a mais dois ciclos de partição com éter etílico, os sobrenadantes combinados foram rotaevaporados (Fisatam, Modelo 558, Brasil) até completa secagem (Hermlí, modelo Z200A, Alemanha) e o extrato residual suspenso em 1 mL metanol, centrifugado durante 4 minutos a 14000 G (Eppendorf 22331, Hamburgo, Alemanha), diluídos 10 vezes em metanol: água (70:30) para injeção em sistema HPLC-ESI-MS/MS.

A separação cromatográfica e análise espectrométrica das massas foram realizadas em um cromatografia líquido de alta eficiência, modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadrupolo e *ion trap* linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSprayTM (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) em modo negativo. O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos.

Os compostos foram separados em coluna SynergiTM (4.0 µm, 2.0 x 150 mm d.i., Phenomenex, EUA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95 % e água 5 % (A) e de água com ácido fórmico 0,1 % (B). A separação foi realizada a 30 °C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90 % A; 7 – 10 min, 90 % A; 10 – 17 min, 10 % A. O fluxo utilizado foi de 250 µl/min e o volume de injeção foi de 10 µL. Os compostos foram monitorados utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos através da comparação com os respectivos padrões disponíveis comercialmente. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados (INCT- Catálise) no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos para as determinações realizadas em triplicata foram expressos como médias e desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As amostras LB e LU após secas e moídas, foram caracterizadas por meio de análises físicas e químicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3 e expressos em base seca. Segundo Patzak (2010), a composição química do lúpulo, pode ser afetada e variar de acordo com fatores ambientais como a composição do solo onde o mesmo foi cultivado, a localização geográfica, ano da colheita e diferenças intrínsecas entre as variedades. Desta forma, a partir dos resultados obtidos, algumas diferenças foram percebidas entre as amostras de lúpulo.

Tabela 1- Composição físico-química de lúpulo (LB e LU), em base seca

Análises	Amostras	
	LB	LU
Proteína *	12,20 ± 0,15 ^a	16,55 ± 0,1 ^b
Umidade *	9,03 ± 0,12 ^a	8,63 ± 0,06 ^b
Lipídios *	7,95 ± 0,07 ^a	15,41 ± 0,43 ^b
Cinzas *	6,81 ± 0,21 ^a	10,31 ± 0,09 ^b
Fibra bruta *	22,20 ± 0,54 ^a	14,68 ± 0,67 ^b
Carboidrato*	64,01 ± 0,49 ^a	49,38 ± 0,47 ^b

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

*Expresso em g/ 100g; LB (lúpulo de origem brasileira); LU (lúpulo proveniente dos EUA)

Para as duas amostras de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade, LB e LU, houve diferença estatística ao nível de 5% de significância. O LB apresentou o maior teor de fibra bruta $22,99 \pm 0,54$ % (m/m) e menor teor de lipídeos $7,95 \pm 0,07$ % (m/m), enquanto o LU teve o menor valor de fibra bruta, $14,68 \pm 0,67$ % (m/m) e maior porcentagem de lipídeos $15,41 \pm 0,43$ % (m/m). A principal diferença entre os resultados deve-se ao fato da amostra LB ter sido coletada *in natura* contendo elevado quantidade de galhos e folhas que são fontes de fibras. Já a amostra LI é um produto comercial na forma de *pellets*, contendo menos resíduos de fibras e maior quantidade de lipídeos (Figura 1).

Figura 1- A – Amostra de lúpulo brasileiro (LB). B – Amostra de lúpulo importado (LI) da variedade Cascade utilizado no presente trabalho



Fonte: O autor.

Ao comparar os resultados de composição físico-química determinados para LB e LU com dados existentes na literatura para o lúpulo em flor, observou-se que o teor de proteínas encontrado para o lúpulo LU ($16,55 \pm 0,1\%$) está de acordo com o relatado na literatura (13 - 18 %), já o LB ($12,20 \pm 0,15\%$) apresentou um teor de proteína um pouco inferior (12,20%). Para a umidade, ambas as amostras (LB- $9,03 \pm 0,12\%$ / LU- $8,63 \pm 0,06\%$) apresentaram teor inferior ao descrito (10 - 12%), o teor de lipídeos, tanto para LB ($7,95 \pm 0,07\%$) quanto para LU ($15,41 \pm 0,43\%$) foi superior ao encontrado na literatura (2,3 - 3,0%), para a análise de cinzas (LB- $6,81 \pm 0,21\%$ / LU- $10,31 \pm 0,09$) ambas as amostras apresentaram valores próximos ao relatado (7 - 10%), essa diferença deve-se provavelmente a grande diversidade de lúpulos existentes e a dificuldade de estimar com precisão esses parâmetros para todas as variedades (VENTURINI FILHO, 2005).

As informações referentes a essas análises são escassas na literatura, tanto que não foram encontrados resultados antes relatados para fibras brutas e carboidratos.

Deve-se levar em consideração também o fato da amostra LU ter passado por um processo de “peletização” que é um processo mecânico, o qual utiliza uma combinação de umidade, calor e pressão para se obter os *pellets*, desta forma esse processo pode deixar os compostos lipídicos da matriz vegetal mais expostos para a extração (ABDOLLAHI et al., 2012; VENTURINI FILHO, 2005).

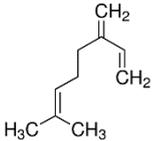
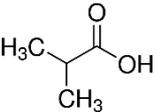
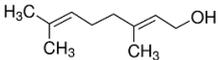
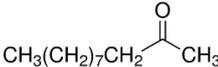
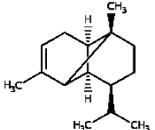
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

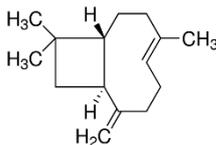
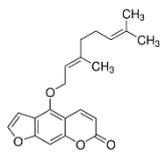
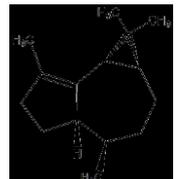
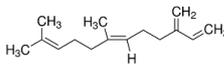
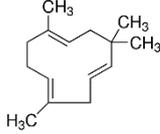
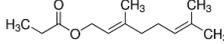
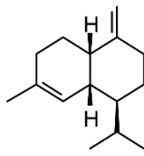
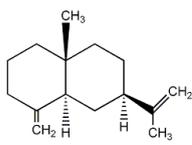
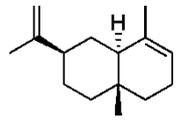
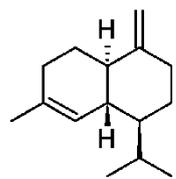
Os resultados para a caracterização química dos óleos essenciais OLB e OLU podem ser observados na Tabela 2.

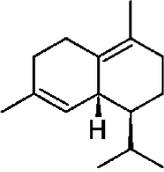
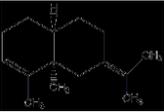
Para o OLB foram determinados e quantificados 20 diferentes compostos, dentre eles, 10 compostos, foram identificados. Os compostos majoritários em OLB foram o *trans*- β -farneceno (20,60%) seguido do β -selineno (18,78%), mirceno (16,57%), α -selineno (16,22%), β -cariofileno (5,24%) e o 2-Undecanona (4,27%).

Já para o OLU foram observados e quantificados 20 compostos, dos quais 13 foram identificados. Destes, os compostos majoritários foram o α -humuleno (35,35%) seguido do mirceno (22,35%), β -cariofileno (12,81%) e *trans*- β -farneceno (10,59%), apresentando uma maior diversidade de compostos identificados.

Tabela 2 - Caracterização química de óleos essenciais de lúpulo brasileiro (OLB) e produzido nos EUA (OLU)

Componentes	Estrutura	TR	IRc	IR-lit	OLB (%)	OLI (%)
Mirceno		7,79; 7,82	989; 990*	992	6,57	22,35
Ácido isobutírico		8,57	1017	1020	-	0,83
ND	-	10,95	1101	-	-	0,41
Geraniol		14,85	1252	1253	-	1,13
2-Undecanona		15,86	1293	1295	4,27	-
α -Ilangenol		17,84	1379	1376	-	0,92

β -Cariofileno		18,83; 18,85*	1424; 1425*	1427	5,24	12,81
Bergamotina		19,08; 19,10*	1436; 1437*	1436	0,88	0,51
α -Aromadendrina		19,24	1443	1441	2,37	-
<i>trans</i> - β -Farneceno		19,47; 19,48*	1454; 1455*	1457	20,60	10,59
α -Humuleno		19,60; 19,62*	1460; 1461*	1460	0,32	35,35
Geranil propionato		19,80	1470	1475	-	0,60
ND	-	19,97	1477	-	1,81	-
γ -Muuroloeno		20,00	1479	1480	-	1,46
ND	-	20,28	1492	-	-	0,33
β -Selineno		20,32; 20,33*	1494; 1495*	1495	18,78	2,69
α -Selineno		20,46; 20,47*	1501	1501	16,22	2,93
ND	-	20,62	1509	-	-	1,91
γ -Cadineno		20,81	1518	1520	-	1,36

δ -Cadineno		20,90	1522	1524	0,46	2,11
ND	-	20,95	1525	-	0,52	-
ND	-	21,01	1528	-	-	0,45
ND	-	21,31	1543	-	2,82	-
Selina-3,7(11)-dieno		21,40	1547	1546	3,09	-
ND	-	21,76	1565	-	0,90	-
ND	-	22,30	1592	-	0,43	-
ND	-	22,79	1616	-	-	0,77
ND	-	23,05	1630	-	0,29	-
ND	-	23,64	1661	-	-	0,49
ND	-	23,65	1662	-	1,97	-
ND	-	23,70	1665	-	1,78	-
ND	-	23,85	1672	-	0,68	-
Total identificado	-	-	-	-	88,80	95,64
Total ND **	-	-	-	-	11,20	4,36

ND = compostos não identificado, TR = tempo de retenção (minutos), IRc = índice de retenção calculado, IR-lit = índice de retenção encontrado na literatura (NIST, 2018), % = porcentagem do componente no óleo essencial, * = TR e IRc separados por ponto e vírgula são valores referentes aos óleos essenciais de lúpulo brasileiro (OLB) e proveniente EUA (OLU), respectivamente, ** = componentes que divergem de interpretação pelos espectros de massa ou com índice de retenção não coerente com os valores encontrados na literatura.

O α -humulene é um dos compostos relatados em maior quantidade na literatura para os óleos essenciais de lúpulo. Concentração pode variar de acordo com a variedade. Para a amostra de OLB a quantidade observada deste composto foi pequena (0,32%) quando comparada com a amostra de OLU (35,35%) e com estudos anteriores (MONGELLI et al., 2016; MONGELLI et al., 2015; FARAG; PORZET, 2012). Provavelmente isso se deve as condições de cultivo, região, solo e temperatura diferenciados.

Mongelli et al., (2016) realizaram a caracterização química de 22 óleos essenciais de diferentes variedades de lúpulo. Dentre elas, os autores identificaram 39 compostos para o

lúpulo Cascade em flor proveniente dos USA, no qual os compostos majoritários foram: mirceno (47,13%), seguido do α -humulene (15,83%) e do β -cariofileno (5,95%). A maioria dos compostos relatados por Mongelli et al., (2016) também foi observada nas amostras do presente estudo.

3.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados para atividade antioxidante de ELB, ELU, OLB e OLU estão apresentados na Tabela 3. Foi observado que para os dois testes realizados, ABTS e DPPH, os extratos obtiveram uma maior atividade antioxidante quando comparado com os óleos essenciais.

O ELB apresentou maior potencial antioxidante seguido do ELU, óleo essencial de lúpulo brasileiro (OLB) e, por último, o OLU. Os resultados sugerem que, tanto no extrato como no óleo essencial, a atividade antioxidante desses compostos é maior no lúpulo brasileiro.

Além disso, deve-se considerar o fato de a amostra de lúpulo brasileiro ser em flor e a de lúpulo importado ser em *pellets*. Segundo Kowalczyk et al., (2013), durante o processamento de *pellets* de lúpulo, a matéria-prima é exposta a temperaturas de até 55 °C em presença de oxigênio, desta forma alguns compostos com ação antioxidante sensíveis ao calor e ao oxigênio podem ter sofrido degradação. Estudos mostram que o processo de “peletização” leva a perda da atividade antioxidante do lúpulo, no entanto, essa perda é muito baixa e normalmente não excede 5% da ação. Desta forma, essa diferença de valores encontrados nas amostras provavelmente não está relacionada com o processamento e sim com o local de cultivo (KOWALCZYK et al., 2013; KROFTA et al., 2008).

Tabela 3- Atividade antioxidante dos extratos de lúpulo em comparação como o óleo essencial de lúpulo

Amostras	ABTS ($\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$)
ELB	8632,23 \pm 10,29 ^a	8272,40 \pm 206,06 ^a
ELU	7924,56 \pm 7,31 ^b	7585,52 \pm 65,79 ^b
OLB	7073,95 \pm 3,28 ^c	3297,88 \pm 59,37 ^c
OLU	3904,82 \pm 5,57 ^d	1425,09 \pm 29,68 ^d

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey. TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox). ELB (extrato de lúpulo brasileiro) ELU (extrato de lúpulo dos EUA); OLB (óleo essencial de lúpulo brasileiro) OLU (óleo essencial de lúpulo dos EUA).

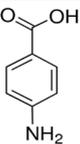
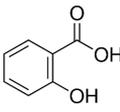
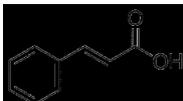
Outros trabalhos também mostraram que o lúpulo possui um alto potencial antioxidante. Aron et al., (2012) observaram 70 % de inibição do radical DPPH pelo extrato de lúpulo da variedade Galena. Krofta et al., 2008 relataram uma atividade antioxidante de 70 a 80% em lúpulos da variedade Saaz e Spalter Select para o mesmo radical. Kowalczyk et al., (2013) observaram EC_{50} variando de 1.0 a 1.5 $mg mL^{-1}$ em extratos de lúpulo da variedade Magnum e Marynka para o teste de ABTS.

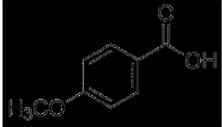
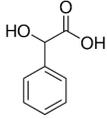
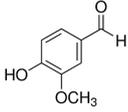
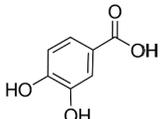
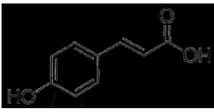
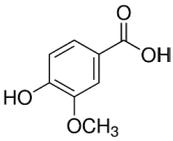
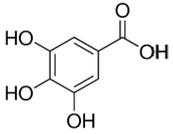
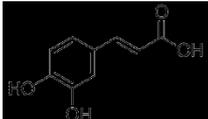
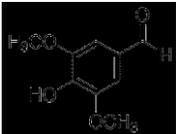
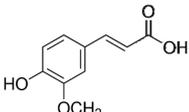
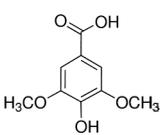
O fato de o potencial antioxidante do extrato dos lúpulos apresentarem-se maiores do que os dos óleos essenciais sugere que os extratos contêm compostos que possuem maior atividade antioxidante, como o ácido protocatecuico, isoquercetina, ácido ferúlico, quercetina. Este resultado também são muito positivo, pois a quantidade matéria-prima, energia e água utilizada para a extração hidroalcoólica é muito menor do que a utilizada para a extração de óleo essencial.

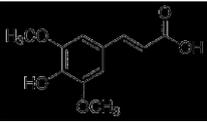
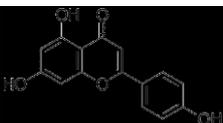
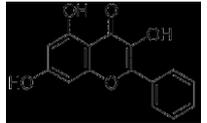
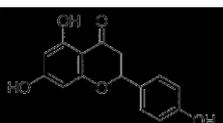
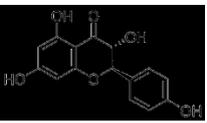
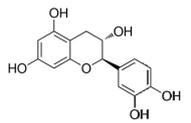
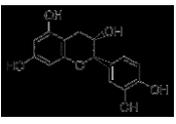
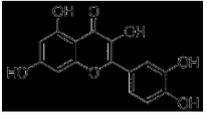
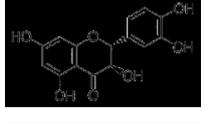
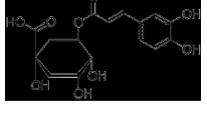
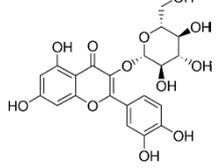
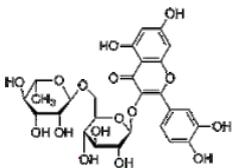
3.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DOS LÚPULOS

A Tabela 4 mostra a identificação e quantificação de cada composto fenólico encontrado nos lúpulos da variedade Cascade analisados. Para todos os 46 padrões fenólicos estabelecidos (Anexo I), 25 compostos foram identificados e 20 foram quantificados no LB. Para o LU, foram identificados 24 compostos e quantificados 18. Entre os compostos identificados, 22 deles estavam presentes em ambos os lúpulos.

Tabela 4- Perfil fenólico dos lúpulo da variedade Cascade produzidos no Brasil (LB) e nos EUA (LU)

Compostos Fenólicos ($mg 100 g^{-1}$)	Estrutura química	LB	LU
Ácido 4-aminobenzóico		$0,19 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$
Ácido salicílico		$0,04 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
Ácido cinâmico		<LOQ	<LOQ

Ácido p-anísico		$0,06 \pm 0,00$	<LOQ
Ácido mandélico		$0,19 \pm 0,01$	<LOQ
Vanilina		$0,08 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$
Ácido 4-hidroximetilbenzóico		<LOQ	-
Ácido Protocatecuico		$11,39 \pm 1,04$	$4,18 \pm 0,17$
Ácido p-cumárico		$0,84 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,01$
Ácido vanílico		$0,42 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,00$
Ácido gálico		$0,18 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$
Ácido cafeico		$1,38 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,10$
Siringaldeido		<LOQ	<LOQ
Ácido ferúlico		$4,48 \pm 0,08$	$1,45 \pm 0,62$
Ácido siríngico		$0,31 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,01$

Ácido sinápico		-	$0,01 \pm 0,00$
Apigenina		$0,01 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
Galangina		<LOQ	<LOQ
Naringenina		<LOQ	-
Aromadendrin		$0,04 \pm 0,00$	<LOQ
Catequina		$0,09 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,07$
Epicatequina		-	$0,01 \pm 0,00$
Quercetina		$3,00 \pm 1,16$	$1,51 \pm 0,08$
Taxifolina		$0,03 \pm 0,00$	-
Ácido Clorogênico		$0,80 \pm 0,09$	$1,05 \pm 0,13$
Isoquercetina		$4,90 \pm 0,28$	$2,44 \pm 0,16$
Rutina		$1,18 \pm 0,00$	$1,06 \pm 0,15$

LOQ = limite de quantificação

Os principais compostos fenólicos encontrados em todos os extratos foram ácido protocatecuico (LB $11,39 \pm 1,04 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; LU $4,18 \pm 0,17 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) seguido da isoquercetina (LB $4,90 \pm 0,28 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; LU $2,44 \pm 0,16 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido ferúlico (LB $4,48 \pm 0,08 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; LU $1,45 \pm 0,62 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), quercetina (LB $3,00 \pm 1,16 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; UH $1,51 \pm 0,08 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$), ácido cafeico (LB $1,38 \pm 0,04 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; LU $1,37 \pm 0,10 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e rutina (LB $1,18 \pm 0,00 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$; LU $1,06 \pm 0,15 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$).

Os lúpulos apresentaram composição semelhante. No entanto, alguns compostos só foram observados no LB, como o 4- ácido hidroximetil benzóico, naringenina e a taxifolina, já os compostos ácido sinápico e epicatequina só foram identificados no LU. Além disso, o lúpulo brasileiro apresentou maior concentração para a maioria dos compostos identificados.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o teor de ácido clorogênico na amostra LU, que passou pelo processo de peletização, esse composto fenólico é considerado um dos mais instáveis a temperatura, apresentando um maior teor na amostra LU e demonstrando que o processamento para formação de *pellets*, não influenciou no seu teor de compostos fenólicos e conseqüentemente na atividade antioxidante (KOWALCZYK et al., 2013; KROFTA et al., 2008).

Os lúpulos LB e LU analisados pelo presente trabalho apresentaram alto teor de compostos fenólicos, além de apresentar composição muito semelhante a outras variedades relatadas na literatura. Estudos anteriores realizados para a variedade Vital, Jelínek et al. (2014) relataram os compostos, catequina, epicatequina e ácido ferúlico, também encontrados na variedade Cascade do presente estudo. Para as variedades Agnus, Bor, Harmonie, Premiant, Rubín, Sládek, Saaz, da República Tcheca, os autores identificaram ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, rutina, ácido elágico, quercetina, ácido gálico, catequina, ácido siríngico, epicatequina, cumarina, ácido ρ -cumárico, ácido trans-cinâmico, naringenina, ácido gentísico, ácido caórico e ácido ferúlico, nos quais a maioria desses compostos também foi observada no presente trabalho, conforme descrito na Tabela 4 (JELÍNEK et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

O presente estudo relatou a composição físico-química e fenólica de LB e LU (variedade Cascade) pela primeira vez. A composição química dos óleos essenciais, bem como a atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais das amostras LB e LU, foram descritas. Os principais compostos fenólicos identificados no lúpulo, LB e LU, incluem ácido protocatecuico, isoquercitrina, ácido ferúlico, quercetina, ácido cafeico e a rutina. Os óleos essenciais apresentaram uma rica composição de α -humuleno, *trans*- β -farneseno, β -selineno, mirceno, α -selineno, β -cariofileno e 2-undecanona. O cultivar do Brasil apresentou composição físico-química diferente daquela produzida nos EUA, devido a diversas variáveis. Quando comparados ao óleo essencial aos extratos de lúpulo apresentaram maior atividade antioxidante principalmente devido ao seu conteúdo significativo de compostos fenólicos, como confirmado pela cromatografia líquida.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. R.; RAVINDRAN, V.; WESTER, T. J., RAVINDRAN, G.; THOMAS, D. V. Effect of improved pellet quality from the addition of a pellet binder and/or moisture to a wheat-based diet conditioned at two different temperatures on performance, apparent metabolizable energy and ileal digestibility of starch and nitrogen in broilers. **Animal Feed Science and Technology**. v. 175, p. 150-157, 2012.

American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Essential Oil in Hops and Hop Pellets. **Journal**. 1988. doi: 10.1094/ASBCMOA-Hops-13.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington, 1995.

ARON, P. M.; TING, P.L.; SHELLHAMMER, T. H. HPLC-ESI-MS Identification of hopderivedpolyphenols that contribute antioxidant capacity and flavor to beer. In: QIAN, M. C.; SHELLHAMMER, T. H., editors. **Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages**. p. 217–234, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.,E.; BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT- Food Science and Technology**. v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Norma Aprovada. Resolução RDC nº 360, maio 2003.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing: Science and practice. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap.7.

FARAG M. A.; PORZEL A.; SCHMIDT J.; WESSJOHANN L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Journal Metabolomics**. v.8, p.492-507, 2012.

JELINEK, L.; KARABIN, M.; KOTLIKOVA, B.; HUDCOVA, T.; DOSTALEK, P. Application of a hop byproduct in brewing: reduction in the level of haze-active prolamines and improved antioxidant properties of the beer. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 120, p. 99–104, 2014.

JELINEK, L.; SNEBERGER, M.; KARABIN, M.; DOSTALEK, P. Comparison of Czech Hop Cultivars Based on their Contents of Secondary Metabolites. **Czech Journal of Food Sciences**. V. 28, p. 309–316, 2010.

KAVALIER, A. R.; LITT, A.; MA, C.; PITRA, N. J.; COLES, M. C.; KENNELLY, E. J.; MATTHEWS, P. D. Phytochemical and Morphological Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Cones over Five Developmental Stages Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry, Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection, and Light Microscopy Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 4783–4793, 2011

KOWALCZYK, D.; ŚWIECA M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103–110, 2013.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 160–166. 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p.127-130, 2001.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; CALIGIANI, A.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Are *Humulus lupulus* L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A phytochemical approach. **Industrial Crops and Products**. v. 83, p. 693–700, 2016.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from

Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**. v. 70, p. 16–27, 2015.

National Institute of Standards and Technology. Livro de química na web. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 8 julho. 2018.

PATZAK, J.; NESVADBA, V.; HENYCHOVA, A.; KROFTA, K. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, p. 136–145, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**. v. 26, p. 1231–1237, 1999.

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; DE GOIS, J. S.; DE ALMEIDA, T. S.; VITALI, L.; SPUDEIT, D. A.; MICKE, G. A.; BORGES, D. L. G.; FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**. v. 77, p. 125-131, 2015.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 11, p. 463-471, 1963.

VENTURINI FILHO W. G. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 347 – 378 p.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 383–396, 2008.

CAPÍTULO 4: Aplicação dos extratos de lúpulo brasileiro e dos EUA (*Humulus lupulus* L. var. Cascade) em filmes poliméricos

RESUMO

Os filmes foram preparados com diferentes proporções dos polímeros, quitosana e PVA, gerando quatro formulações diferentes, em cada uma dessas foram adicionadas 10, 20 e 40 % dos extratos de lúpulo brasileiro (LB) e proveniente dos EUA (LU). Desta forma, o objetivo deste estudo e verificar qual a melhor combinação dos polímeros, quitosana e PVA, adicionadas dos extratos e lúpulo LB e LU, para a obtenção de um protótipo de embalagem ativa para alimentos. As formulações obtidas foram avaliadas quanto aos parâmetros de cor, propriedades mecânicas e ângulo de contato com solventes de diferentes polaridades, desta forma foi escolhida a melhor formulação, F2 (70% quitosana (QTS)/ 30% poli (álcool vinílico) (PVA) e 10% sorbitol (SBT)), para a caracterização por análises térmicas, atividade antioxidante, microscopia eletrônica de varredura, comportamento reológico da solução fitogênica e atividade antioxidante dos filmes. A cor dos filmes contendo extratos (LB e LU) expressaram a cor amarela e sofreu maior variação quanto maior a proporção de extrato adicionado nos filmes. A formulação F2 apresentou melhor característica quanto à propriedades mecânicas e a solubilidade observada pela análise de ângulo de contato e os resultados das demais análises de caracterização se mostraram adequados para filmes poliméricos finos. Quanto à atividade antioxidante, os filmes contendo extratos LU se destacaram em comparação com os contendo LB em todas as concentrações testadas, provavelmente os filmes contendo LU possui maior afinidade com o solvente em que foram submetidos. Pode-se observar também que quanto maior a proporção de extratos de ambos os lúpulos no filme, maior a sua atividade antioxidante para os métodos testados. De acordo com os resultados pode-se sugerir que os filmes da formulação F2 contendo os extratos de LB e LU são eficazes para a utilização como embalagem ativa em alimentos com o intuito de prevenir contra a oxidação.

Palavras-chave: Embalagem ativa; Atividade antioxidante; Lúpulo brasileiro.

ABSTRACT

The films were prepared with different proportions of polymers, chitosan and PVA, generating four different formulations, in each of these were added 10, 20 and 40% of the Brazilian (BH) and United States (UH) hop extracts. Thus, the objective of this study is to verify the best combination of polymers, chitosan and PVA, added from extracts and hops BH and UH, to obtain an active food packaging prototype. The formulations obtained were evaluated for color parameters, mechanical properties and contact angle with solvents of different polarities, so the best formulation was chosen, F2 (70% chitosan (QTS) / 30% poly (vinyl alcohol) (PVA) and 10% sorbitol (SBT)) for characterization by thermal analysis, antioxidant activity, scanning electron microscopy, rheological behavior of phytogetic solution and antioxidant activity of films. The color of the films containing extracts (BH and UH) expressed the yellow color and the greater the proportion of extract added in the films. Formulation F2 presented better characteristics regarding mechanical properties and solubility observed by contact angle analysis and the results of the other characterization analyzes were suitable for thin polymeric films. Regarding the antioxidant activity, films containing UH extracts stood out compared to those containing BH at all concentrations tested, probably containing films with higher affinity with the solvent in which they were submitted. It can also be observed that the higher the proportion of extracts of both hops in the film, the greater its antioxidant activity for the tested methods. According to the results it can be suggested that films of formulation F2 containing BH and UH extracts are effective for use as active packaging in foods to prevent oxidation.

Keywords: Active packaging; Antioxidant activity; Brazilian hops.

1. INTRODUÇÃO

Para uma embalagem ser considerada ativa a mesma necessita possuir funções além das consideradas tradicionais, sendo esta permitir adequado acondicionamento dos alimentos de forma que os protejam contra fatores externos como a luz, umidade, ar, agentes microbianos, entre outros, que possam prejudicar a qualidade destes produtos até chegarem ao consumidor final. Essa atividade visa aumentar a vida de prateleira e/ ou contribuir para a segurança alimentar, bem como melhorar a qualidade sensorial durante a vida útil do alimento, interagindo com o alimento e proporcionando benefícios, como ação antioxidante e antimicrobiana (MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014; OTONI et al. 2016).

O desenvolvimento de filme contendo extratos de lúpulo de origem brasileira (LB) e dos EUA (LU) tem como objetivo produzir protótipos de embalagens com ação antioxidante para alimentos e verificar qual dos dois extratos possam proporcionar melhores características físicas e atividade antioxidante quando adicionados nos filmes.

Para isso, foram produzidos filmes de quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol com a adição de extratos de lúpulo LB e LU. A QTS é um copolímero derivado da quitina, que é comumente encontrada no exoesqueleto de crustáceos e insetos. Quimicamente a quitosana é um amino polissacarídeo catiônico de elevada massa molecular, solúvel em ácidos orgânicos, sendo considerada segura para consumo humano (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) (MUJTABA et al., 2019; MACHADO, 2017; MACHOVÁ et al., 1999).

O PVA também é um polímero considerado seguro para consumo humano, por ser biocompatível e não tóxico apesar de ser sintético, possui também característica de ser hidrossolúvel, biodegradável o que promove a sua utilização na indústria de alimentos (NEAMTU et al., 2007). Apresenta elevada resistência mecânica e flexibilidade, possuindo assim boa formação de filmes (CHEN et al., 2014). Filmes poliméricos contendo QTS e PVA, são estudados e conhecidos por apresentam melhores propriedades mecânicas e viscoelásticas quando comparados com os polímeros puros. Da mesma forma, o sorbitol é um plastificante amplamente utilizado em filmes em composição de sistemas de embalagens (MACHADO, 2017; PARPARITA; CHIABURU; VASILE, 2012).

Estudos comprovam que o lúpulo, e os seus extratos, possuem propriedades biológicas como efeito sedativo, prevenção contra o câncer, atividade antioxidante, atividade estrogênica, ação pesticida e efeitos antibacteriano e antifúngico. O potencial antioxidante do lúpulo deve-se aos flavonoides presentes, esses compostos representam o maior grupo de polifenóis vegetais. Além da importante ação antioxidante, os compostos do lúpulo apresentam também

ação antimicrobiana. Esta ação ocorre principalmente em bactérias Gram positivas (BLAND et al., 2015; KARABIN et al., 2015; FUSSYA et al., 2013; SILVA; FARIA, 2008; STEVENS; PAGE, 2004; TROUILLAS et al., 2003).

Desta forma a incorporação de extratos de lúpulo em filme polimérico, visa promover propriedade antioxidante e antimicrobiana no mesmo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade e de origem brasileira (LB), utilizado neste estudo, foi gentilmente doado pela empresa Brasil Kirin (Itu, São Paulo). As amostras foram cultivadas entre os meses de outubro de 2015 e abril de 2016 na cidade de São Bento do Sapucaí, São Paulo, Brasil, com localização geográfica de coordenadas 22°37'32.3"S 45°34'54.0"W, e colhidas na primeira semana de abril de 2016. As amostras de lúpulo foram armazenadas a vácuo, a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ e ao abrigo da luz, até o envio para o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/ UFSC), Florianópolis – SC. As amostras recebidas foram liofilizada (JJ Científica, modelo LJJ02, Brasil) a $-52 \pm 2^\circ\text{C}$ e 0,381 mmHg de vácuo por 24 horas e em seguida trituradas em moinho de facas (Quimis, modelo Q298A21, Brasil) e armazenadas em embalagem de polietileno, ao abrigo da luz a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, até a realização dos experimentos.

A amostra de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Cascade proveniente dos EUA (LU), foi gentilmente cedida pela empresa de insumos para produção de cervejas Brewtime (São José dos Campos, São Paulo) e armazenado nas mesmas condições do LB.

Os reagentes ABTS, DPPH e os polímeros utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, EUA).

2.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE LÚPULO

Para obtenção dos extratos de LB e LU foram considerados os resultados para otimização do processo de extração, conforme descrito no item 2.3 do Capítulo 2. Assim, uma alíquota de 1 g de LB e LU foi suspensa em solução extratora de etanol de 49% (v:v), com relação sólido/líquido de 1 g por 34 mL. A extração foi realizada em banho de ultrassom (Ultronique, modelo Q5.9137A, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) com volume de trabalho de 5,7 L (dimensões internas de 30x15x15 cm). A frequência e o tempo de trabalho foram fixados em 37 kHz por 30 minutos, a 52°C . Após a extração, os extratos de LB e LU foram centrifugados por 25 minutos a 5.000 rpm (Hermle centrífuga, modelo Z200A, Gosheim, Alemanha), o sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman N° 1, em atmosfera modificada com nitrogênio e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração ($6 \pm 2^\circ\text{C}$). Obtendo assim extrato de lúpulo brasileiro (LB) e de lúpulo produzidos nos EUA (LU).

2.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES

Primeiramente foram preparadas as soluções dos polímeros, soluções de quitosana (QTS) (2 %; m/ m) em ácido acético aquoso (1% v/v) e poli (álcool vinílico) (PVA) (2 %; m/m) em água destilada. As soluções foram mantidas sobre agitação mecânica (Dist, Brasil), até completa dissolução dos polímeros (YOSHIDA et al. 2009).

As soluções filmogênicas foram obtidas pela mistura de diferentes proporções de QTS e PVA gerando quatro formulações diferentes de filmes, conforme a Tabela 1. Após a homogeneização completa das soluções de blendas poliméricas, adicionou-se sorbitol a 10 % (m/ m) em relação à massa dos polímeros.

Tabela 1 – Formulações obtidas para os filmes poliméricos

Formulações	QTS (2 % - m/ m)	(PVA) (2 % - m/ m)
F1	100%	0%
F2	70%	30%
F3	50%	50%
F4	30%	70%

Para cada uma das formulações foram adicionadas 10, 20, e 40 % dos extratos de LB e LU, além das formulações controle sem adição dos extratos, gerando assim 28 diferentes combinações de soluções filmogênicas.

Em seguida, os filmes foram preparados pelo método de *casting* pesando-se 10 g das soluções filmogênicas em placas de Petri de poliestireno (9 cm). As placas foram mantidas em capela de exaustão de gases fechada, sob abrigo da luz, a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 24 horas, até completa evaporação do solvente. Após secagem, os filmes foram removidos manualmente com o auxílio de uma espátula e armazenados em dessecador contendo partículas de sílica, ao abrigo da luz, para futuras análises.

2.4 DETERMINAÇÃO DA COR

A cor dos filmes foi determinada utilizando um colorímetro Minolta (CR 400; Minolta, Japão), de acordo com a escala de Hunter e CIE (CIELab 2000). Valores de cores L^* (luminosidade), a^* (verde- vermelho) e b^* (amarelo-azul) foram obtidos a partir de três

medições das amostras de filme, e uma placa de cor branca foi usada como padrão para a calibração. Foram calculadas a diferença total de cor (ΔE^*), Equação 1, comparando as formulações contendo extrato com o filme controle (sem extrato), as coordenadas cilíndricas (*Chroma* - C^* intensidade da cor e *Hue* - H^* tonalidade ou cor propriamente dita) foi calculada utilizando a Equação 2 e 3 (MARIA et al., 2008).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Onde:

$$\Delta a = a^*_{controle} - a^*_{amostra}$$

$$\Delta b = b^*_{controle} - b^*_{amostra}$$

$$\Delta L = L^*_{controle} - L^*_{amostra}$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$H^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

2.5 DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO E ENERGIA LIVRE SUPERFICIAL

O ângulo de contato dos filmes foi obtido utilizando o equipamento OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), com sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente (20 ± 5 °C) e o volume dos líquidos depositado sobre a superfície de cada filme foi de 5, 4 e 0,8 μL para água deionizada, formamida e diodometano, respectivamente. As medidas do ângulo estático e os dados apresentados correspondem ao valor da média final. A energia livre superficial e seus componentes (polar e dispersivo) nos filmes foram calculados pelo modelo de Owens-Wendt, geralmente utilizado para sólidos com baixa energia superficial, tais como os polímeros. Esses pesquisadores provaram que a energia livre superficial total de um sólido (γ_s) pode ser expressa como a soma do componente dispersivo (γ_L^d) e polar (γ_L^p) (Equação 4). A equação de Owens-Wendt (Equação 5) aplica os dados dos líquidos polares e não polares, com componentes

dispersivos e polares conhecidos, da energia livre superficial total e do ângulo de contato (θ) (JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$y_S^T = y_S^d + y_S^p \quad (4)$$

$$y_S(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{y_S^d} y_L^d + \sqrt{y_S^p} y_L^p \right) \quad (5)$$

Onde y_L é a tensão superficial do líquido.

Para esta medida, três diferentes líquidos, água deionizada ($y^T = 72.8$ mN/m, $y^d = 21.8$ mN/m, $y^p = 51.0$ mN/m), diiodometano ($y^T = 50.8$ mN/m, $y^d = 50.8$ mN/m, $y^p = 0$ mN/m) e formamida ($y^T = 58.0$ mN/m, $y^d = 39.0$ mN/m, $y^p = 19.0$ mN/m) foram testados para cada filme.

2.6 MEDIDAS DE ESPESSURA DOS FILMES

A espessura dos filmes foi medida utilizando o micrômetro digital DIGIMESS 110.284 (São Paulo, Brasil) com divisões de 0,01 mm e capacidade de leitura de 0-25 mm. As medidas de espessura foram tomadas aleatoriamente em 5 locais dos corpos de provas em cada replicata.

2.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas dos filmes, tensão máxima e módulo de elasticidade foram obtidos usando o texturômetro TA.TX2-Plus (Stable Micro Systems - Inglaterra), controlado pelo software Exponent Stable Micro System, com célula de carga de 50 kgf, conforme o método ASTM D882-12 (ASTM, 1995), que compreende a determinação das propriedades de tensão ou tração de plásticos em forma de folhas delgadas, como filmes, com espessura menor do que 1,0 mm. As dimensões dos corpos de prova foram de 50 mm de comprimento e 20 mm de largura. Foram efetuadas aproximadamente 10 repetições de cada amostra. Antes das medições, as amostras foram equilibradas durante 48 horas em umidade relativa de 57 %, em dessecador com solução saturada de brometo de sódio (NaBr) a 25 ± 2 °C. As medidas foram efetuadas dentro de um tempo médio de 5 minutos para que as condições de temperatura e umidade relativa do ar não interfiram nos resultados experimentais.

A partir das análises de cor, propriedade mecânica e ângulo de contato energia livre superficial foi escolhida apenas uma formulação para prosseguir as demais análises do experimento.

2.8 MORFOLOGIA DOS FILMES

A morfologia dos filmes contendo extratos de lúpulo (LU e LB) e o filme controle (sem extratos) foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram analisadas amostras de superfície e secção transversal dos filmes (fraturadas em nitrogênio líquido). Depois de realizados os cortes as amostras foram fixadas em um suporte metálico de cobre (*stub*) com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e metalizadas com uma fina camada de ouro (Au) em equipamento a vácuo (Leica, EM SCD500, EUA) para posterior análise no microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV (Tóquio, Japão). A análise foi realizada no centro de microscopia da UFSC.

2.9 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS

As medidas reológicas das soluções filmogênicas das formulações controle e com os extratos, foram realizadas em temperaturas 25 ± 2 °C em um Reômetro Brookfield RVDV-IIIICP, modelo de spindle do tipo SSA, SC4-21 e 27. Os dados foram computados utilizando o Software Rheocalc 32. Todas as amostras foram colocadas em um porta amostras e deixadas em repouso por 10 min antes de começar a análise, para equilibrar a temperatura e induzir o estresse de relaxamento. As medidas de fluxo foram realizadas para cada amostra durante 20 minutos e os parâmetros reológicos (tensão de cisalhamento, taxa de deformação, viscosidade aparente) foram obtidos a partir do *software* Rheocalc32. As curvas de fluxo experimentais foram ajustadas para o modelo de Lei da Potência, dado pela Equação 6.

$$T = K(\dot{\gamma})^n \quad (6)$$

Onde:

T= tensão de cisalhamento (Pa)

K= índice consistência (Pa.sⁿ)

$\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (s⁻¹)

n= índice de comportamento do fluxo (adimensional).

2.10 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise TGA foi usada para avaliar a degradação térmica dos filmes. Foi utilizado o equipamento TGA-50 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para cada amostra de filme foram aquecidos 10 mg em cadinho de platina a uma razão de 10 °C/ min entre 25 e 600 °C, com um fluxo de nitrogênio de 40 mL/min, e calculada a derivada da perda de massa (DTG). A análise foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.11 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para os filmes em equipamento MC-DSC (TA Instruments, EUA). Cada formulação de filme foi submetida a um ciclo de aquecimento de -20 a 140 °C, resfriamento de 140 a -20 °C, e um re-aquecimento até 140 °C, a uma razão de 2 °C/ min e fluxo de nitrogênio de 3 mL/ min, utilizando o cadinho de referência vazio. Os dados obtidos foram tratados em *software* NanoAnalyse (TA Instruments, EUA).

2.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

A AA foi determinada pela capacidade dos compostos presentes nas amostras em inibir o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico). Para avaliar a atividade antioxidante, 100 mg de cada filme foi recortado em pequenos pedaços e agitados em vórtex durante 3 minutos com 5 mL de etanol 85 % (v/ v). A mistura foi colocada em repouso durante 15 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para extração do antioxidante e então novamente agitada por mais 3 minutos (DA ROSA, et al., 2016). Posteriormente a análise foi realizada de acordo com os métodos descritos nos itens 2.6 do Capítulo 3 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSER, 1995; RE et al., 1999).

2.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos para as determinações realizadas em triplicata foram expressos como médias e desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação

de médias realizada pelo Teste de Tukey com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa *software* Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA COR DOS FILMES

Os filmes obtidos a partir de QTS, PVA e sorbitol, foram caracterizados para a avaliação dos parâmetros de cor dos mesmos, e estes resultados são apresentados na Tabela 2. Para os filmes, foram testadas diferentes concentrações de extrato de LB e LU, afim de avaliar a possível diferença estatística nos parâmetros de cor, L^* , a^* , b^* . As formulações apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação a cor expressa pelo filme controle no parâmetro a^* (<0 = verde; >0 = vermelho) e no b^* (<0 = azul; >0 = amarelo) aumentando a expressão da cor verde e amarela com o aumento da concentração dos extratos.

Os valores de a^* e b^* corroboram com os observados para H° (tonalidade) que variaram de $95,56 \pm 0,10$ a $99,31 \pm 0,17$ e $98,98 \pm 0,58$ a $104,55 \pm 0,24$ para os filmes contendo LB e LU respectivamente, encontrando-se no quadrante entre 90° (amarelo) e 180° (verde). De acordo com a escala CIE-Lab esses resultados sugerem que todas as amostras de filmes contendo extratos LB e LU expressam a cor amarela, representadas pelos valores de H° próximos a 90° .

Em geral, as diferentes concentrações dos polímeros nas formulações não afetaram os parâmetros da análise de cor, ao passo que, os filmes apresentaram cor amarelo característica da presença de extrato de lúpulo rico em flavonoides, principalmente o composto quercetina que possui coloração amarela, e foi o composto observado em maior quantidade nos extratos de lúpulo LB e LU (SHI et al., 2019).

O parâmetro L^* , indica a luminosidade (transparência), podendo variar de 0 a 100, todas as formulações dos filmes apresentaram elevada luminosidade, entre $90,43 \pm 0,29$ a $96,27 \pm 0,18$, sendo que a transparência diminuiu com o aumento da adição dos extratos. Estes valores podem estar diretamente relacionados com o parâmetro C^* (intensidade da cor) e a ΔE (variação da cor em relação ao branco), pois estes também aumentaram com o incremento na concentração dos extratos LB e LU nos filmes. Bajić et al., (2019) observaram resultados semelhantes na avaliação da transmitância óptica e opacidade, na qual os filmes de quitosana adicionados de extrato de lúpulo obtido por extração por fluido supercrítico, diminuíram a transmitância e aumentaram a opacidade com a adição de maiores concentrações dos extratos. Desta forma, podemos afirmar que quanto maior a adição de extratos LB e LU nos filmes poliméricos de QTS, PVA e sorbitol, maior será a variação da cor e a intensidade expressa, e conseqüentemente, menor a sua luminosidade. De modo geral para os parâmetros avaliados não

existe diferença da cor entre os extratos de lúpulo LB e LU. Esses resultados podem ser melhor observados visualmente na Tabela 3.

Com base em uma análise visual das imagens dos filmes na (Tabela 3) pode-se observar que os filmes apresentaram também uniformidade na cor.

Kowalczyk et al., (2016) aplicaram extrato etanólico de lúpulo em filmes de carboximetilcelulose, amido de batata oxidado, proteína isolada de soja e gelatina. Os autores encontraram valores semelhantes de L^* (79 a 85), a^* (-0,8 a 3,8) e b^* (7 a 22). Assim como o presente trabalho, ainda relatam que quanto maior a concentração de extrato, adicionada menor é a transparência do filme. Desta forma, os filmes com menor transparência podem atuar também como barreira para a exposição dos alimentos à luz, protegendo dos defeitos de qualidade (como oxidação de gordura e mudanças de sabor) em produtos fotossensíveis, sendo importante que os materiais de embalagem devam possuir as propriedades desejadas de bloqueio de raios UV (Kowalczyk et al., 2016).

Tabela 2 – Parâmetros L^* , a^* e b^* , coordenadas polares (C^* e H°) e variação total da cor (ΔE) dos filmes com diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Amostras	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*	ΔE
Branco	95,65 ± 0,09 ^{i,j,k}	0,04 ± 0,03 ^m	2,80 ± 0,12 ^a	-	-	-
F1/10/LB	93,41 ± 0,14 ^{c,d,e}	-2,55 ± 0,11 ^{g,h}	15,81 ± 0,64 ^{f,g}	16,01 ± 0,64 ^{f,g}	99,31 ± 0,17 ^e	13,44 ± 0,62 ^f
F1/20/LB	92,90 ± 0,24 ^c	-4,11 ± 0,21 ^b	25,45 ± 0,49 ^h	25,77 ± 0,51 ^h	99,16 ± 0,27 ^{d,e}	23,18 ± 0,48 ^g
F1/40/LB	90,43 ± 0,29 ^a	-4,07 ± 0,10 ^b	37,50 ± 0,64 ⁱ	37,71 ± 0,62 ^j	96,19 ± 0,25 ^{a,b,c}	35,32 ± 0,57 ⁱ
F2/10/LB	94,30 ± 0,01 ^{d,e,f,g,h}	-1,84 ± 0,06 ^{i,j,k}	12,47 ± 0,47 ^{d,e}	12,59 ± 0,47 ^{d,e}	98,37 ± 0,02 ^{c,d,e}	9,93 ± 0,47 ^{d,e}
F2/20/LB	93,07 ± 0,18 ^c	-3,51 ± 0,02 ^{b,c,d,e}	23,31 ± 0,06 ^h	23,57 ± 0,05 ^h	98,55 ± 0,07 ^{d,e}	20,97 ± 0,02 ^g
F2/40/LB	91,62 ± 0,27 ^b	-3,71 ± 0,09 ^{b,c,d}	30,99 ± 0,04 ⁱ	31,21 ± 0,03 ⁱ	96,81 ± 0,17 ^{a,b,c,d}	28,71 ± 0,06 ^h
F3/10/LB	94,40 ± 0,01 ^{e,f,g,h}	-1,91 ± 0,14 ^{i,j}	12,78 ± 0,81 ^{d,e,f}	12,91 ± 0,82 ^{d,e,f}	98,50 ± 0,08 ^{c,d,e}	10,23 ± 0,81 ^{d,e}
F3/20/LB	93,18 ± 0,57 ^{c,e}	-3,18 ± 0,08 ^{d,e,f}	22,74 ± 2,96 ^h	22,96 ± 2,91 ^h	98,02 ± 1,22 ^{b,c,d,e}	20,34 ± 2,95 ^g
F3/40/LB	90,65 ± 0,05 ^{a,b}	-3,36 ± 0,07 ^{c,d,e,f}	34,49 ± 0,09 ^j	34,64 ± 0,09 ^j	95,56 ± 0,10 ^a	32,25 ± 0,10 ⁱ
F4/10/LB	95,37 ± 0,25 ^{h,i,j,k}	-1,28 ± 0,01 ^{k,l}	9,13 ± 0,06 ^c	9,21 ± 0,06 ^{b,c}	97,98 ± 0,03 ^{b,c,d,e}	6,46 ± 0,05 ^{b,c}
F4/20/LB	92,92 ± 0,14 ^c	-2,83 ± 0,06 ^{f,g,h}	22,67 ± 0,17 ^h	22,84 ± 0,17 ^h	97,10 ± 0,10 ^{a,b,c,d,e}	20,25 ± 0,19 ^g
F4/40/LB	91,74 ± 0,01 ^b	-2,98 ± 0,13 ^{e,f,g}	29,78 ± 1,38 ⁱ	29,92 ± 1,38 ⁱ	95,71 ± 0,02 ^{a,b}	27,42 ± 1,36 ^h
F1/10/LI	95,84 ± 0,53 ^{i,j,k}	-1,70 ± 0,26 ^{j,k}	7,77 ± 0,22 ^{b,c}	7,94 ± 0,26 ^{a,b,c}	102,28 ± 1,50 ^{f,g}	5,27 ± 0,31 ^{a,b,c}
F1/20/LI	94,40 ± 0,01 ^{e,f,g,h}	-3,71 ± 0,11 ^{b,c,d}	16,22 ± 0,71 ^g	16,63 ± 0,71 ^g	102,88 ± 0,16 ^{f,g}	13,98 ± 0,70 ^f
F1/40/LI	94,02 ± 0,19 ^{c,d,e,f,g}	-5,78 ± 0,12 ^a	24,17 ± 0,04 ^h	24,85 ± 0,01 ^h	103,43 ± 0,29 ^{f,g}	22,20 ± 0,02 ^g
F2/10/LI	96,27 ± 0,18 ^k	-0,84 ± 0,10 ^l	5,31 ± 0,28 ^{a,b}	5,37 ± 0,28 ^a	98,98 ± 0,58 ^{d,e}	2,71 ± 0,31 ^a
F2/20/LI	94,85 ± 0,21 ^{f,g,h,i}	-3,62 ± 0,19 ^{b,c,d}	14,87 ± 0,03 ^{e,f,g}	15,30 ± 0,07 ^{e,f,g}	103,66 ± 0,66 ^{f,g}	12,63 ± 0,06 ^{e,f}

F2/40/LI	93,84 ± 0,20 ^{c,d,e,f}	-5,82 ± 0,09 ^a	24,71 ± 0,49 ^h	25,38 ± 0,49 ^h	103,24 ± 0,05 ^{f,g}	22,74 ± 0,50 ^g
F3/10/LI	96,00 ± 0,04 ^{j,k}	-1,53 ± 0,08 ^{j,k}	7,29 ± 0,48 ^{b,c}	7,44 ± 0,45 ^{a,b}	101,89 ± 1,40 ^f	4,76 ± 0,42 ^{a,b}
F3/20/LI	95,06 ± 0,04 ^{g,h,i,j}	-3,73 ± 0,07 ^{b,c,d}	14,67 ± 0,57 ^{e,f,g}	15,13 ± 0,57 ^{e,f,g}	104,27 ± 0,27 ^g	12,45 ± 0,56 ^{e,f}
F3/40/LI	93,77 ± 0,37 ^{c,d,e,f}	-5,89 ± 0,23 ^a	25,08 ± 0,35 ^h	25,76 ± 0,39 ^h	103,20 ± 0,32 ^{f,g}	23,12 ± 0,37 ^g
F4/10/LI	95,74 ± 0,08 ^{i,j,k}	-2,34 ± 0,13 ^{h,i}	10,40 ± 0,13 ^{c,d}	10,65 ± 0,15 ^{c,d}	102,68 ± 0,50 ^{f,g}	7,95 ± 0,16 ^{c,d}
F4/20/LI	94,40 ± 0,79 ^{e,f,g,h}	-3,92 ± 0,08 ^{b,c}	15,08 ± 0,57 ^{e,f,g}	15,58 ± 0,56 ^{e,f,g}	104,55 ± 0,24 ^g	12,97 ± 0,48 ^{e,f}
F4/20/LI	94,26 ± 0,16 ^{d,e,f,g,h}	-5,32 ± 0,42 ^a	22,79 ± 0,37 ^h	23,39 ± 0,45 ^h	103,12 ± 0,78 ^{f,g}	20,73 ± 0,47 ^g

F1100QTS/0PVA/10SBT

F2-70QTS/30PVA/10SBT

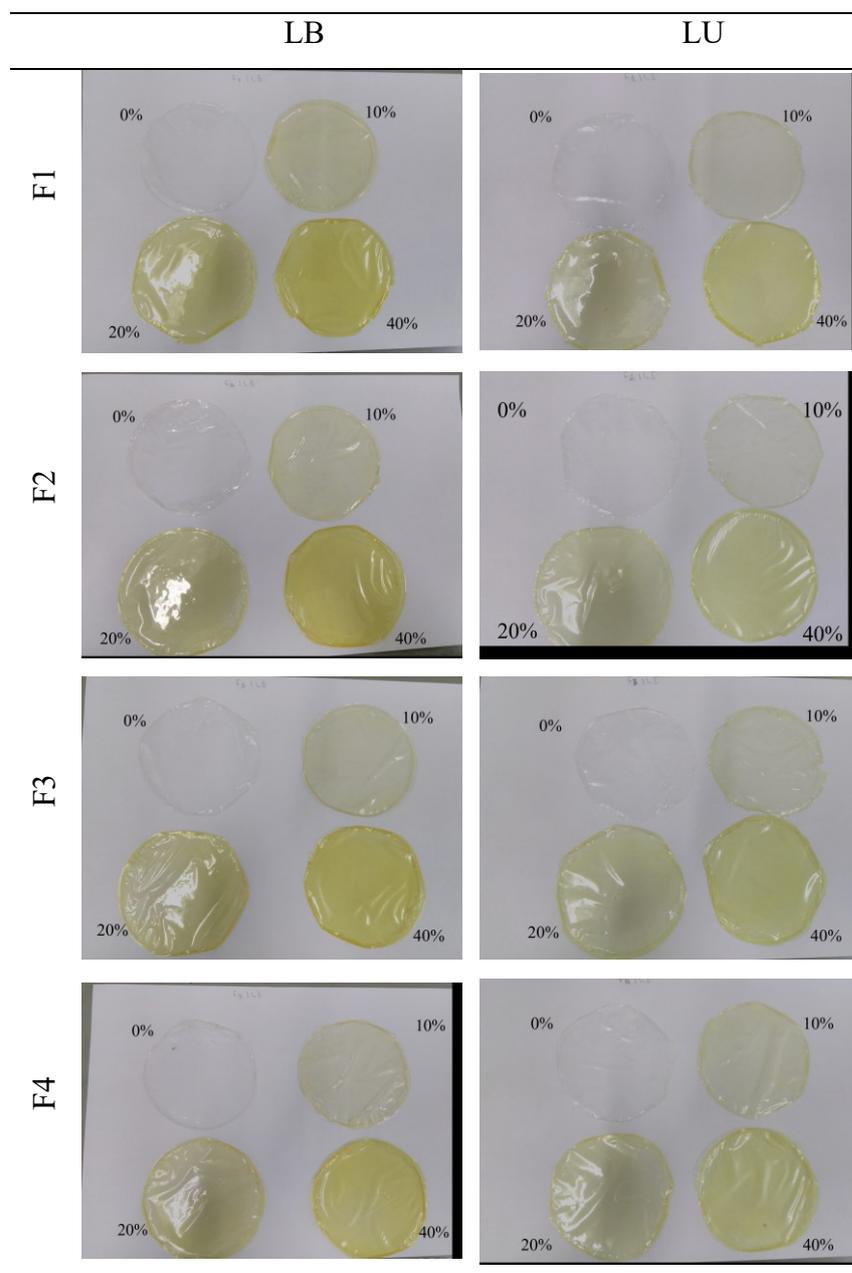
F3-50QTS/50PVA/10SBT

F4-30QTS/70PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Tabela 3 – Filmes poliméricos, com diferentes concentrações de LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)



F1-100QTS/0PVA/10SBT

F2-70QTS/30PVA/10SBT

F3-50QTS/50PVA/10SBT

F4-30QTS/70PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

3.2 ÂNGULO DE CONTATO E ENERGIA LIVRE SUPERFICIAL

A Tabela 4 mostra os valores de ângulos de contato dos filmes estudados em relação aos solventes testados (água, formamida e diiodometano) e a energia livre superficial total e os componentes polar e dispersivo dos filmes de QTS, PVA e sorbitol puros e com extratos de lúpulo LB e LU.

Segundo Noronha et al., (2014) a medida do ângulo de contato de líquidos com diferentes polaridades com a superfície da amostra define a relação da polaridade da superfícies. Para valores do ângulo de contato com a água menores que 90° , a superfície é considerada hidrofílica e maiores que 90° , hidrofóbica.

Ao observar os resultados, apenas uma das formulações apresentou ângulo de contato com a água acima de 90° , ou seja, com característica hidrofóbica

Tabela 4 – Ângulo de contato, energia livre superficial total, componente dispersivo e componente polar dos filmes em contato com a água, formamida e diiodometano. Onde C (controle), LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Amostra	Ângulo de Contato			Energia Livre Superficial		
	Água	Formamida	Diiodometano	γ^T (mN/m)	γ^d (mN/m)	γ^p (mN/m)
F1/0/C	86,66 ± 1,79 ^{f,g}	63,55 ± 1,38 ^{b,c,d,e}	56,85 ± 0,94 ^e	32,7	27,57	5,13
F1/10/LB	82,51 ± 1,56 ^{c,d,e,f,g}	61,53 ± 3,10 ^{b,c}	55,20 ± 0,30 ^{d,e}	33,85	27,2	6,66
F1/20/LB	75,35 ± 2,75 ^{a,b,c,d}	65,35 ± 0,57 ^{c,d,e}	46,22 ± 1,06 ^{a,b,c}	36,63	28,95	7,68
F1/40/LB	72,76 ± 5,01 ^{a,b,c}	64,25 ± 1,92 ^{b,c,d,e}	47,46 ± 2,09 ^{a,b,c}	36,68	27,41	9,27
F2/0/C	82,30 ± 2,16 ^{c,d,e,f,g}	64,17 ± 1,15 ^{b,c,d,e}	50,68 ± 3,00 ^{b,c,d,e}	35,1	29,44	5,66
F2/10/LB	77,77 ± 3,32 ^{d,e,f}	64,64 ± 1,78 ^{b,c,d,e}	47,05 ± 1,83 ^{a,b,c}	36,42	29,59	6,86
F2/20/LB	87,19 ± 2,16 ^{f,g}	65,62 ± 2,97 ^{c,d,e}	48,22 ± 1,70 ^{a,b,c,d}	36,23	32,8	3,42
F2/40/LB	80,86 ± 5,82 ^{c,d,e,f}	64,20 ± 1,49 ^{c,d,e}	49,92 ± 0,49 ^{a,b,c}	35,38	29,28	6,1
F3/0/C	77,57 ± 5,33 ^{a,b,c,d,e,f}	63,50 ± 6,35 ^{b,c,d,e}	44,16 ± 0,66 ^{a,b,c}	37,79	31,3	6,49
F3/10/LB	79,85 ± 2,44 ^{a,b,c,d,e,f}	62,40 ± 2,59 ^{b,c,d}	44,39 ± 2,72 ^{a,b,c}	38,02	32,33	5,68
F3/20/LB	79,53 ± 0,30 ^{a,b,c,d,e,f}	65,81 ± 1,58 ^{c,d,e}	42,93 ± 1,57 ^a	37,77	32,46	5,32
F3/40/LB	81,59 ± 2,77 ^{c,d,e,f,g}	67,71 ± 0,62 ^{c,d,e}	45,51 ± 3,09 ^{a,b,c}	36,39	31,59	4,8
F4/0/C	83,23 ± 3,14 ^{c,d,e,f,g}	28,90 ± 3,36 ^a	47,99 ± 7,04 ^{a,b,c}	43,12	36,08	7,04
F4/10/LB	81,92 ± 6,05 ^{c,d,e,f,g}	56,22 ± 0,96 ^b	46,83 ± 1,01 ^{a,b,c}	38,51	36,79	5,72
F4/20/LB	85,39 ± 2,06 ^{d,e,f,g}	66,90 ± 2,50 ^{c,d,e}	45,43 ± 1,43 ^{a,b,c}	36,99	33,45	3,54
F4/40/LB	82,22 ± 5,54 ^{c,d,e,f,g}	65,60 ± 4,09 ^{c,d,e}	47,06 ± 2,12 ^{a,b,c}	36,28	31,31	4,96
F1/0/C	86,66 ± 1,79 ^{f,g}	63,55 ± 1,38 ^{b,c,d,e}	56,85 ± 0,94 ^e	32,7	27,57	5,13

F1/10/LU	80,36 ± 1,05 ^{b,c,d,e,f}	71,02 ± 0,89 ^{d,e}	48,57 ± 1,45 ^{a,b,c,d}	34,29	28,78	5,51
F1/20/LU	76,83 ± 1,77 ^{a,b,c,d,e,f}	65,70 ± 0,76 ^{c,d,e}	44,91 ± 3,87 ^{a,b,c}	36,98	30,23	6,75
F1/40/LU	91,48 ± 1,33 ^g	66,12 ± 3,76 ^{c,d,e}	50,33 ± 0,44 ^{b,c,d,e}	35,76	33,34	2,43
F2/0/C	82,30 ± 2,16 ^{c,d,e,f,g}	64,17 ± 1,15 ^{b,c,d,e}	50,68 ± 3,00 ^{b,c,d,e}	35,1	29,44	5,66
F2/10/LU	78,80 ± 1,41 ^{a,b,c,d,e,f}	63,22 ± 2,98 ^{b,c,d,e}	46,86 ± 1,05 ^{a,b,c}	36,82	30,35	6,48
F2/20/LU	76,05 ± 4,25 ^{a,b,c,d,e}	68,80 ± 3,56 ^{c,d,e}	46,34 ± 0,59 ^{a,b,c}	35,71	28,63	7,08
F2/40/LU	86,62 ± 3,86 ^{e,f,g}	65,89 ± 1,07 ^{c,d,e}	51,00 ± 0,32 ^{c,d,e}	34,81	30,81	3,99
F3/0/C	77,57 ± 5,33 ^{a,b,c,d,e,f}	63,50 ± 6,35 ^{b,c,d,e}	44,16 ± 0,66 ^{a,b,c}	37,79	31,3	6,49
F3/10/LU	77,11 ± 4,03 ^{a,b,c,d,e,f}	65,59 ± 2,20 ^{c,d,e}	44,99 ± 1,29 ^{a,b,c}	36,97	30,32	6,66
F3/20/LU	69,49 ± 3,81 ^a	71,29 ± 0,72 ^c	43,70 ± 0,40 ^{a,b}	36,41	27,06	9,35
F3/40/LU	85,51 ± 2,96 ^{d,e,f,g}	65,58 ± 3,29 ^{c,d,e}	49,36 ± 1,24 ^{a,b,c,d}	35,52	31,38	4,14
F4/0/C	83,23 ± 3,14 ^{c,d,e,f,g}	28,90 ± 3,36 ^a	47,99 ± 7,04 ^{a,b,c}	43,12	36,08	7,04
F4/10/LU	70,20 ± 3,25 ^{a,b}	62,44 ± 4,22 ^{b,c,d}	50,04 ± 0,46 ^{b,c,d,e}	36,68	25,29	11,39
F4/20/LU	85,68 ± 2,74 ^{d,e,f,g}	66,99 ± 2,48 ^{c,d,e}	45,22 ± 1,63 ^{a,b,c}	37,1	33,69	3,41
F4/40/LU	78,76 ± 1,29 ^{a,b,c,d,e,f}	67,25 ± 2,96 ^{c,d,e}	48,24 ± 0,91 ^{a,b,c,d}	35,33	28,91	6,41

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. γ^T : energia livre superficial total; γ^d : componente dispersivo; γ^p : componente polar. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey, comparando todas as medidas para cada um dos parâmetros.

F1-100QTS/0PVA/10SBT

F2-70QTS/30PVA/10SBT

F3-50QTS/50PVA/10SBT

F4-30QTS/70PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

O ângulo formado entre os filmes quando em contato com a água, variou de $64,49 \pm 3,81$ (F3/20/LU) a $91,48 \pm 1,33$ (F1/40/LU). Já para a formamida, o ângulo de contato variou de $56,22 \pm 0,86$ (F4/10/LB) a $71,29 \pm 0,72$ (F3/20/LU), e de $42,93 \pm 1,57$ (F3/20/LB) a $55,20 \pm 0,30$ (F1/10/LB) para o diiodometano. Os filmes com maior proporção de QTS (F1) apresentaram menor interação com a água quando comparados com os filmes contendo PVA (F2, F3, F4) este mesmo comportamento foi observado para o solvente de polaridade intermediária testado (formamida). Já para o ângulo de contato formado entre os filmes e o diiodometano, os filmes contendo maior proporção de PVA apresentaram maior afinidade pelo solvente (Tabela 3). Os resultados observados estão de acordo com a literatura, que descreve a QTS como um polímero pouco solúvel em água e o PVA possuindo maior afinidade com esse solvente (MUJTABA et al., 2019; MACHADO, 2017).

Segundo Carvalho (2013), quanto maior a hidrofiliçidade (afinidade com a água) de um filme, maior o ângulo de contato formado com o diiodometano e menor o ângulo de contato formado com a água. Desta forma, os resultados dos ângulos de contato dos filmes, apresentaram menor interação com a água quando comparados com os resultados obtidos para o diiodometano, que apresentaram ângulos de contato menores, indicando maior interação do filme com o solvente de menor polaridade. Para a formamida, solvente de polaridade intermediária, os ângulos de contato de todos os filmes se situaram entre os valores encontrados para a água e para o diiodometano.

Os resultados sugerem ainda que a incorporação dos extratos LB e LU e as proporções dos mesmos nas formulações não afetaram as propriedades de interação com os solventes testados.

No que diz respeito à energia livre superficial total, os valores se mostraram menores para os filmes contendo maior proporção de QTS e aumentaram em relação à quantidade de PVA nos filmes, apresentando maiores valores para as formulações com mais PVA. A mesma tendência foi observada para o componente polar. Já para o componente dispersivo (hidrofóbico) a relação foi inversa, sugerindo uma menor afinidade com a água para os filmes contendo QTS, e maior afinidade com a água para os filmes contendo PVA.

3.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESPESSURA DOS FILMES

Segundo Lazaridou e Biliaderis, (2002) a determinação dos parâmetros de propriedades mecânicas dos filmes, que são protótipos de embalagens ativa para alimentos, é importante para caracterizar os mesmos quanto a sua integridade física como barreira para a proteção do

conteúdo. Sendo crucial para garantir a integridade dos filmes durante os processos logísticos e o armazenamento, evitando assim a deterioração dos alimentos devido à quebra da embalagem (Priyadarshi et al., 2018). Os resultados para as propriedades mecânicas dos filmes foram obtidos a partir das curvas da tensão-deformação e podem ser observados na Tabela 5.

O módulo de Young (elasticidade) é um parâmetro que caracteriza a rigidez de um material, derivado da relação linear entre a tensão aplicada e a deformação sofrida, é determinado pela inclinação da curva de tensão pela deformação na região elástica. Sendo que quanto maior o valor para o módulo de Young, maior será a resistência à deformação e rigidez, ou seja, o filme apresenta uma menor flexibilidade (DA ROSA, 2015; ROTTA et al., 2009; CANEVAROLO, 2004).

Para o parâmetro deformação na ruptura os resultados sugerem uma tendência ao aumento desse valor conforme o aumento da proporção de PVA nas formulações testadas, essa aptidão também foi observada por Machado et al., (2017). Esse aspecto pode ser explicado pela característica isolada de cada polímero utilizado, a QTS é relatada como sendo um material facilmente rompido em testes tensão, devida à formação de uma matriz polimérica rígida, pouco flexível e quebradiça. Já o PVA é um polímero que possui maior flexibilidade e resistência à ruptura, desta forma a incorporação de PVA junto da QTS explica o aumento da deformação na ruptura, pois a presença das moléculas do PVA tende a diminuir a rigidez dos filmes (MUJTABA et al., 2019; LIU et al., 2018; LI et al., 2010).

Tabela 5 – Propriedades mecânicas dos filmes de QTS, PVA e Sorbitol contendo extratos de lúpulo em diferentes concentrações. Onde C (controle), LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Amostra	Deformação na ruptura (%)	Tensão na ruptura (MPa)	Modulo de Young(MPa)
F1/0/C	19,47 ± 3,50 _{g,h,i,j,l,m}	14,01 ± 2,39 _f	48,51 ± 5,63 _b
F1/10/LB	11,33 ± 5,14 _{a,b,c,d,e,f}	11,43 ± 4,74 _e	58,12 ± 8,31 _{c,d}
F1/20/LB	8,58 ± 3,12 _{a,b,c,d,e}	9,46 ± 1,85 _{d,e}	64,75 ± 12,50 _d
F1/40/LB	3,69 ± 2,08 _a	4,90 ± 1,29 _b	75,77 ± 15,36 _e
F2/0/C	17,21 ± 8,38 _{f,g,h,i,j,l,m}	0,02 ± 0,00 _a	0,18 ± 0,08 _a
F2/10/LB	13,44 ± 2,91 _{b,c,d,e,f,g,h,i}	0,02 ± 0,00 _a	0,51 ± 0,20 _a
F2/20/LB	10,18 ± 1,18 _{a,b,c,d,e,f}	0,02 ± 0,00 _a	0,59 ± 0,14 _a
F2/40/LB	10,20 ± 1,94 _{a,b,c,d,e,f}	0,02 ± 0,00 _a	0,54 ± 0,15 _a
F3/0/C	19,37 ± 8,24 _{g,i,j,l,m}	0,02 ± 0,00 _a	0,15 ± 0,06 _a
F3/10/LB	11,91 ± 3,68 _{b,c,d,e,f,g,h}	0,01 ± 0,00 _a	0,25 ± 0,07 _a
F3/20/LB	15,81 ± 6,60 _{d,e,f,g,h,i,j,l}	0,02 ± 0,00 _a	0,22 ± 0,09 _a
F3/40/LB	7,45 ± 3,97 _{a,b}	0,01 ± 0,00 _a	0,38 ± 0,13 _a
F4/0/C	47,59 ± 5,30 _n	0,03 ± 0,00 _a	0,05 ± 0,00 _a
F4/10/LB	21,07 ± 5,32 _{ij,l,m}	0,02 ± 0,00 _a	0,10 ± 0,02 _a
F4/20/LB	23,62 ± 6,34 _m	0,02 ± 0,00 _a	0,08 ± 0,01 _a
F4/40/LB	12,99 ± 5,23 _{b,c,d,e,f,g,h}	0,01 ± 0,00 _a	0,16 ± 0,05 _a
F1/0/C	19,47 ± 3,50 _{g,h,i,j,l,m}	14,01 ± 2,39 _f	48,51 ± 5,63 _b
F1/10/LU	14,01 ± 4,14 _{b,c,d,e,f,g,h,i}	10,47 ± 2,81 _e	55,08 ± 4,63 _{b,c}
F1/20/LU	9,32 ± 3,27 _{a,b,c,d,e,f}	7,43 ± 1,45 _{c,d}	54,26 ± 10,08 _{b,c}
F1/40/LU	7,39 ± 2,98 _{a,b,c}	6,72 ± 1,64 _{b,c}	64,23 ± 11,95 _d
F2/0/C	17,21 ± 8,38 _{f,g,h,i,j,l,m}	0,02 ± 0,00 _a	0,18 ± 0,08 _a
F2/10/LU	14,91 ± 2,41 _{c,d,e,f,g,h,i,j}	0,02 ± 0,00 _a	0,18 ± 0,07 _a
F2/20/LU	12,15 ± 2,53 _{b,c,d,e,f,g,h}	0,01 ± 0,00 _a	0,31 ± 0,15 _a
F2/40/LU	11,80 ± 2,73 _{b,c,d,e,f,h}	0,01 ± 0,00 _a	0,30 ± 0,04 _a
F3/0/C	19,37 ± 8,24 _{g,i,j,l,m}	0,02 ± 0,00 _a	0,15 ± 0,06 _a
F3/10/LU	11,96 ± 3,69 _{b,c,d,e,f,g}	0,01 ± 0,00 _a	0,27 ± 0,07 _a
F3/20/LU	12,91 ± 3,39 _{b,c,d,e,f,g,h}	0,02 ± 0,00 _a	0,27 ± 0,09 _a
F3/40/LU	8,23 ± 2,13 _{a,b,c,d}	0,01 ± 0,00 _a	0,29 ± 0,07 _a

F4/0/C	47,59 ± 5,30 _n	0,03 ± 0,00 _a	0,05 ± 0,00 _a
F4/10/LU	23,14 ± 6,06 _{l,m}	0,01 ± 0,00 _a	0,07 ± 0,02 _a
F4/20/LU	22,11 ± 5,85 _{j,l,m}	0,01 ± 0,00 _a	0,08 ± 0,01 _a
F4/40/LU	16,19 ± 3,57 _{e,f,g,h,i,j,m}	0,01 ± 0,00 _a	0,11 ± 0,04 _a

Valores apresentados como a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,10$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

Legenda:

F1-100QTS/0PVA/10SBT

F2-70QTS/30PVA/10SBT

F3-50QTS/50PVA/10SBT

F4-30QTS/70PVA/10SBT

Com 0,10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

Os resultados ainda sugerem que a deformação na ruptura diminuiu com a adição dos extratos LB e LU, ou seja, a aplicação dos extratos tornou os filmes mais rígidos e quebradiços que o controle em todas as formulações testadas, independente do extrato.

Para a tensão na ruptura e módulo de Young, a única formulação que se diferenciou significativamente ($p < 0,05$) das demais foi a F1, apenas essa blenda não continha PVA em sua composição, desta forma esse resultado pode ser relacionado novamente com a característica do PVA, que é considerado um polímero com boa flexibilidade e resistência (MACHADO, 2017).

Quanto à adição de extrato, a tensão na ruptura diminuiu e o módulo de Young aumentou proporcionalmente, seguindo a mesma tendência dos resultados da deformação na ruptura.

Com base nas propriedades mecânicas, os filmes elaborados não apresentaram diferenças significativas quanto aos parâmetros estudados para a adição de PVA. Assim, a formulação contendo a menor concentração de PVA (F2) e um baixo módulo de Young se demonstra pouco rígida e com maior flexibilidade, sendo selecionada para os demais estudos. Além disso, através da interação com os solventes estudados, F2 também foi considerada a formulação ideal para aplicação desejada, tendo em vista a baixa afinidade por solventes polares, como a água, presente em grandes quantidades na maioria dos alimentos *in natura*.

As espessuras dos filmes poliméricos da formulação F2 podem ser observadas na Tabela 6, esse parâmetro é importante pois pode influenciar na vida de prateleira do alimento embalado. Alguns estudos relatam que o tipo de polímero, quantidade e natureza do ativo

disperso nos filmes pode afetar a espessura dos filmes (JAMSHIDIAN et al., 2012; SALMIERI; LACROIX, 2006; SEBTI et al., 2007).

Os valores de espessura para os filmes da F2 variaram entre $0,05 \pm 0,00$ mm e $0,09 \pm 0,01$ mm (Tabela 5), estando de acordo com a espessura desejada para filmes finos ($< 1,0$ mm) (PINOTTI et al., 2007). Espessuras semelhantes para filmes de QTS e PVA foram relatadas em outros estudos conduzido por Antoniou et al., 2015 (0,08 mm), Quihui-Cota et al., 2017 relatam uma espessura de 0,086 mm em filmes de quitosana a 2% e Baron et al., 2017 preparou filmes de quitosana e pectina e relataram uma espessura de 0,082 mm para todas as suas formulações. Os resultados também sugerem que a adição dos extratos na formulação afeta diretamente a espessura dos filmes. Ou seja, com o aumento da concentração dos extratos adicionados nas blendas da formulação F2 a espessura dos filmes diminuí, isso pode ser explicado pelo aumento do teor de líquido na solução filmogênica pela adição dos extratos e, conseqüentemente, o menor teor de sólidos.

Tabela 6 – Espessura dos filmes de quitosana, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Amostras	Espessura (mm)
F2 Controle	$0,08 \pm 0,00^a$
F2 10 LB	$0,05 \pm 0,00^b$
F2 20 LB	$0,05 \pm 0,00^{b,c}$
F2 40 LB	$0,06 \pm 0,00^c$
F2 Controle	$0,08 \pm 0,00^a$
F2 10 LU	$0,09 \pm 0,01^a$
F2 20 LU	$0,08 \pm 0,00^a$
F2 40 LU	$0,07 \pm 0,01^d$

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

F2-70QTS/30PVA/10SBT

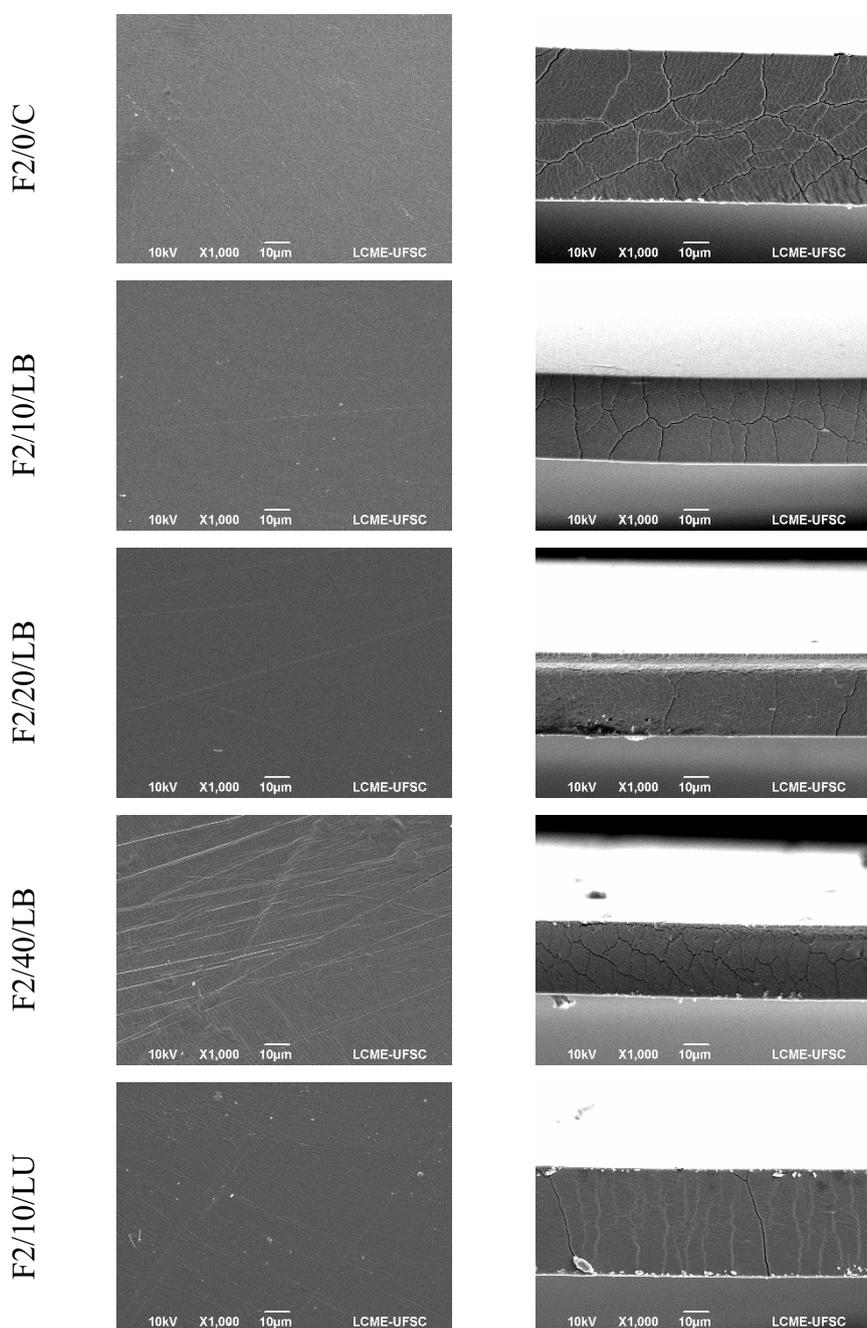
Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

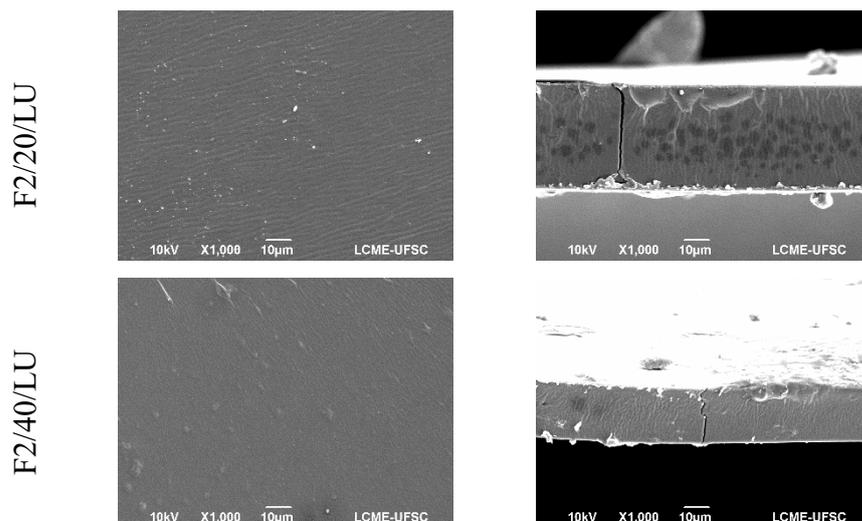
3.4 MORFOLOGIA DOS FILMES CONTENDO EXTRATOS DE LÚPULO LB E LU POR MEV

As micrografias obtidas por MEV, referente à superfície dos filmes e as suas respectivas secções transversais, para os filmes da formulação F2 (controle) e com a adição dos extratos de lúpulo LB e LU, são mostradas na Tabela 7.

No geral, não foram observadas agregações ou separações de fase na superfície dos filmes incorporados com os extratos em relação ao controle. Assim, indicando que os extratos foram dispersos homogeneamente na matriz polimérica, podendo assim confirmar a agregação eficaz dos extratos à matriz filmogênica durante a evaporação do solvente (ROTTA, 2009).

Tabela 7 – Micrografias da superfície dos filmes e seção transversal no aumento de 1000x





F2-70QTS/30PVA/10SBT

Com 0, 10, 20 e 40 % de LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Ao observar as micrografias é possível afirmar que a superfície dos filmes é caracterizada por uma estrutura compacta e homogênea, além da superfície lisa, sem formação de poros ou rachaduras. Já para as micrografias das secções transversais dos filmes, foi possível observar pequenas rachaduras. As mesmas características morfológicas foram observadas por outros autores (MUJTABA et al., 2019; LIU et al., 2018; MACHADO et al., 2017).

A morfologia dos filmes não foi afetada pela adição dos extratos, porém, é visualmente nítido que ao adicionar os extratos a espessura do filme diminuiu, de acordo com os resultados de espessura da Tabela 6.

3.5 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS

As soluções filmogênicas da formulação F2 contendo diferentes concentrações dos extratos LB e LU foram avaliadas em relação ao comportamento reológico. Para isto, foi aplicada a Lei de Potência, a partir da qual é possível obter os seguintes parâmetros reológicos: k (índice de consistência – $\text{mPa}\cdot\text{s}^n$) e n (índice de comportamento de fluxo – adimensional).

Ao observar os resultados (Tabela 8) pode-se afirmar que as soluções filmogênicas apresentaram comportamento pseudoplástico ($n < 1$), desta forma podendo afirmar que as soluções possuem característica de fluidos não newtonianos. Os fluidos com essa característica possuem a tendência de se re-fluidificar quando a taxa de deformação aumenta. HOU et al., (2012) e MARTINEZ et al., (2004) estudaram as características reológicas da quitosana em emulsões sendo que estas apresentaram comportamento de fluidos não newtonianos, semelhante ao presente estudo. Quando o fluido é considerado não newtoniano, quanto maior o valor de k , maior é a consistência do fluido, pois este indicam o grau de resistência do fluido diante do escoamento (DA ROSA, 2016; MACHADO, 2017; LEWANDOWSKA, 2015).

Tabela 8 – Comportamento reológico das soluções formadoras de filmes de QTS, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

Solução	k ($\text{mPa}\cdot\text{s}^n$)	n
F2 Controle	$1737 \pm 14,1^c$	$0,79 \pm 0,00^b$
F2 10 LB	$5022,5 \pm 23,3^d$	$0,68 \pm 0,00^a$
F2 20 LB	$2908,5 \pm 164,7^c$	$0,72 \pm 0,01^{a,b}$
F2 40 LB	$1231,1 \pm 258,8^b$	$0,79 \pm 0,05^b$
F2 Controle	$1737 \pm 14,1^c$	$0,79 \pm 0,00^b$
F2 10 LU	$585,8 \pm 11,4^a$	$0,90 \pm 0,00^c$
F2 20 LU	$396,05 \pm 31,1^a$	$0,90 \pm 0,01^c$
F2 20 LU	$165,05 \pm 15,9^a$	$0,94 \pm 0,01^c$

Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. n : índice de comportamento de fluxo; k : índice de consistência. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

F2-70QTS/30PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

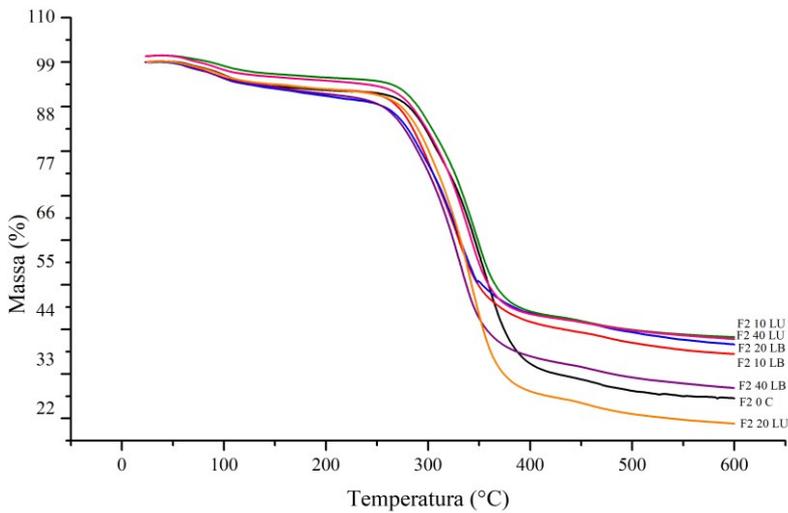
As soluções formadoras dos filmes foram mais consistentes quanto menor a proporção dos extratos (LB e LU). Para os filmes com o extrato LB, o aumento da concentração dos extratos nas soluções teve uma tendência de aumento do n e a diminuição do k , ou seja, com a adição dos extratos a solução filmogênica fica menos consistente e mais fluida, o que não pôde ser observado para os filmes contendo o extrato LU. Isto pode ser resultante das baixas interações hidrodinâmicas nas soluções diluídas pela adição dos extratos e pelo contato entre as cadeias dos polímeros, que fatores que condicionam o fluxo de soluções concentradas.

3.6 ANÁLISES TÉRMICAS DOS FILMES

Análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica utilizada para avaliar a perda de peso de uma amostra em função da degradação pela temperatura, assim avaliando a sua estabilidade térmica e podendo determinar os limites de temperatura para aplicação dos filmes (YOSHIDA et al., 2010; MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

As curvas de TGA obtidas para os filmes poliméricos contendo extrato de lúpulo LB e LU estão apresentados na Figura 1, já os eventos térmicos referentes a taxa de variação de massa (DTG) podem ser observados na Tabela 9.

Figura 1 – Curvas termogravimétricas dos filmes poliméricos de QTS, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)



F2-70QTS/30PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

Tabela 9 – Taxas de variação de massa dos filmes poliméricos de quitosana, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos de acordo com a temperatura. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

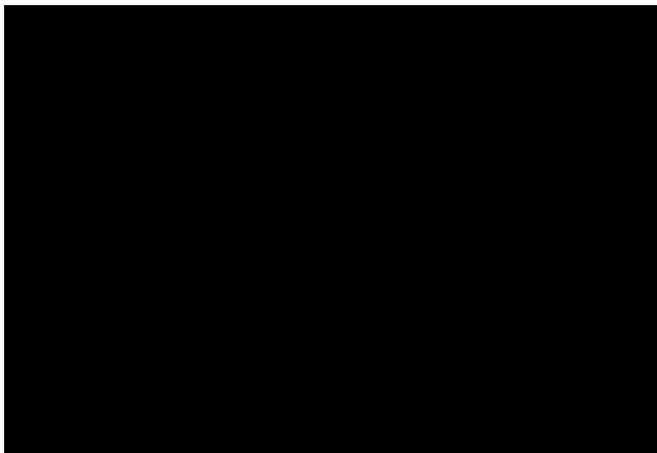
Amostras	Mid Point °C	Onset °C	Endset °C	Massa (mg)	Massa (%)
QTS*	325,82	315,46	338,93	-1,03	-17,2
PVA*	346,04	318,45	381,54	-4,36	-48,15
Sorbitol*	355,19	339,44	372,98	-5,70	-82,63
F2 Controle	341,81	305,09	382,99	-5,92	-68,14
F2 10 LB	316,08	280,97	354,16	-2,78	-52,54
F2 20 LB	317,97	288,69	357,04	-2,69	-47,89
F2 40 LB	318,98	287,09	354,41	-2,97	-59,15
F2 10 LU	333,83	301,96	369,50	-3,77	-61,27
F2 20 LU	331,45	299,38	366,67	-3,58	-68,12
F2 40 LU	328,98	298,59	363,69	-3,53	-60,12

*Valores referentes aos polímeros puros QTS, PVA e Sorbitol segundo Machado et al., (2017)

F2-70QTS/30PVA/10SBT

Com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

Figura 2 – Curvas termogravimétricas dos polímeros quitosana, PVA e sorbitol utilizados na obtenção dos filmes poliméricos



Fonte: Machado et al., (2017)

Segundo Machado, (2017) os polímeros, QTS, PVA e Sorbitol apresentam eventos isolados de perda de massa de acordo com a sua composição, Figura 2. Os filmes controle e contendo os extratos de lúpulo LB e LU apresentaram um estágio para degradação térmica, podendo observar apenas um grande evento de perda de massa, além do referente a água, próximo a 100°C, semelhante aos polímeros de origem, Figura 1 e 2. As temperaturas necessárias para iniciar a degradação térmica são semelhantes aos dados encontrados na literatura (MACHADO, 2017; YOSHIDA et al., 2010).

Em geral, a decomposição inicia em temperatura de 280,97 °C e ocorre até 382,99 °C nos filmes. Já a degradação orgânica das matrizes poliméricas inicia-se na temperatura em 315,46 °C, sendo o polímero mais sensível termicamente, a quitosana (MACHADO, 2017).

Os filmes de QTS, PVA e Sorbitol controle e com a adição de extratos LB e LU apresentaram comportamento semelhante entre si (Figura 1). O filme F2 10 LB apresentou menor temperatura (280,97 °C) necessária para iniciar a degradação da matriz polimérica.

Maior perda de massa foi observada nas formulações controle (sem a adição de extratos), seguido pelas formulações com o extrato LU. Ao passo que, essas amostras apresentaram maior temperatura necessária para que a degradação térmica dos filmes ocorresse, assim, a presença de ambos os extratos nos filmes está relacionada com a diminuição da massa dos filmes e a sua temperatura inicial de decomposição.

Ao observar a curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos polímeros puros e dos filmes das formulações F2, controle e com a adição de extratos, é notada a interação presente entre as matrizes poliméricas, principalmente pelo deslocamentos dos picos de fusão

e cristalização, além das demais transições térmicas. As curvas de DSC dos polímeros QTS, PVA e sorbitol e dos extratos LB e LU utilizados na obtenção dos filmes são apresentadas na Figura 3. Já as curvas para o DSC dos filmes controle e contendo extrato de lúpulo LB podem ser observadas na Figura 4 e contendo LU na Figura 5.

Foi possível observar que de acordo com a composição dos filmes, ocorreu interação na matriz polimérica de todas as amostras testadas, o que foi evidenciado nos termogramas do controle, e dos adicionados de extratos, uma vez que apresentaram comportamento diferenciado (T_g , T_f) dos polímeros puros utilizados na formulação.

Figura 3 – Curvas de DSC dos polímeros quitosana (QTS), poli(álcool vinílico) (PVA) e sorbitol (SBT) utilizados na obtenção. Onde LB (extrato de lúpulo brasileiro) e LU (extrato de lúpulo dos EUA)

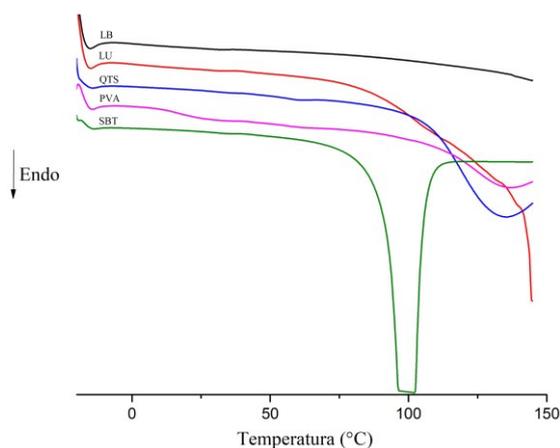


Figura 4 – Curvas de DSC dos filmes contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos LB (extrato de lúpulo brasileiro)

F2-70QTS/30PVA/10SBT, com 10, 20 e 40 % de extratos LB

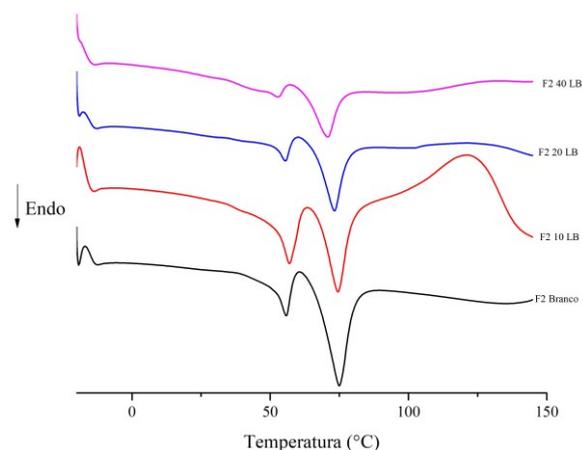
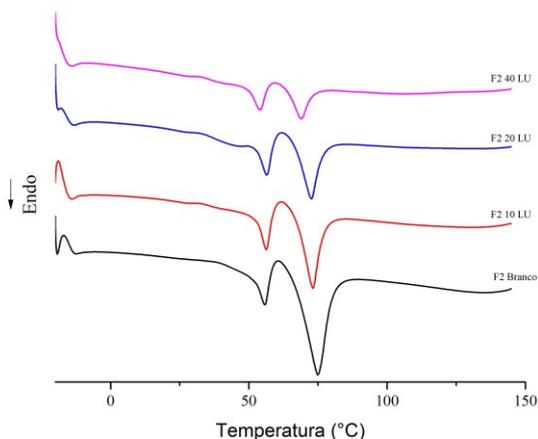


Figura 5 – Curvas de DSC dos filmes contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos LU (extrato de lúpulo proveniente dos EUA)

F2-70QTS/30PVA/10SBT, com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU



O polímero puro QTS, apresentou evento endotérmico na região de 57 °C, com temperatura de fusão acima de 126 °C, eventos endotérmicos que podem ser atribuídos à região de transição vítrea do polímero (MUJTABA et al., 2019). Para o PVA o comportamento endotérmico ocorreu na região de 20 °C e a temperatura de fusão foi superior a 120 °C. O sorbitol não expressou evento endotérmico na faixa de temperatura avaliada e apresentou temperatura de fusão em 96 °C. O mesmo ocorreu para os extratos LB e LU, que não apresentaram eventos endotérmicos e sua temperatura de fusão foi considerada próxima a 150 °C.

Nos termogramas de todos os filmes, controle e com os extratos LB e LU, foi possível observar um pico endotérmico referente à fusão em torno de 70 °C, com posterior cristalização, sendo representado por um evento endotérmico em torno 55 °C, estes eventos se repetiram em todos os filmes estudados. Além disso, ao observar as Figuras 4 e 5 e a Tabela 10, é visível que o ΔH (área do pico), diminui com o aumento do volume de extrato nos filmes. Tal fato ocorre devido a desorganização na estrutura polimérica das misturas de QTS, PVA e Sorbitol. Desta forma, a estrutura dos filmes se apresentou mais amorfa, menos cristalina, quanto maior a adição de extrato nas soluções filmogênicas.

Tabela 10 – Dados obtidos a partir dos termogramas para a estabilidade dos filmes de QTS, PVA e sorbitol contendo diferentes concentrações e extratos de lúpulos.

Amostras	Mid Point °C	Onset °C	Endset °C	ΔH J/g
F2 Controle	74,85	66,75	81,88	-18,50
F2 10 LB	74,49	68,47	79,78	-12,98
F2 20 LB	73,16	67,71	77,51	-7,86
F2 40 LB	70,83	64,26	75,98	-7,20
F2 10 LU	73,18	66,75	82,45	-12,66
F2 20 LU	72,51	65,80	79,77	-10,11
F2 40 LU	68,84	64,62	74,79	-3,83

F2-70QTS/30PVA/10SBT, com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU

LB (extrato de lúpulo brasileiro).

LU (extrato de lúpulo dos EUA).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DOS FILMES CONTENDO EXTRATOS DE LÚPULO (LB E LU)

A determinação da atividade antioxidante foi expressa em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) dos filmes da formulação F2 contendo diferentes concentrações de extratos de lúpulo (LB e LU) estes resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Atividade antioxidante dos filmes contendo extratos de lúpulo LB e LU

Amostras	ABTS ($\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol TEAC mL}^{-1}$)
F2/Controle	14,74 \pm 10,07 ^c	56,41 \pm 3,61 ^a
F2/10/LB	47,97 \pm 3,36 ^{a,c}	74,28 \pm 9,03 ^{a,b}
F2/20/LB	104,15 \pm 2,24 ^{a,b}	101,73 \pm 2,71 ^c
F2/40/LB	199,11 \pm 8,85 ^d	159,82 \pm 7,22 ^e
F2/Controle	14,74 \pm 10,07 ^c	56,41 \pm 3,61 ^a
F2/10/LU	84,37 \pm 5,60 ^{a,b}	92,15 \pm 0,00 ^{b,c}
F2/20/LU	139,76 \pm 14,55 ^b	130,45 \pm 3,61 ^d
F2/40/LU	297,22 \pm 31,33 ^e	217,27 \pm 10,83 ^f

TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox). Valores apresentados como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando analisadas pelo teste de Tukey.

F2-70QTS/30PVA/10SBT, com 10, 20 e 40 % de extratos LB e LU.

LB (extrato de lúpulo brasileiro).

LU (extrato de lúpulo dos EUA).

Está provado que o extrato de lúpulo é capaz de eliminar indutores da oxidação, mesmo após sua incorporação na matriz polimérica. Sendo também possível a relação desta característica com a os compostos fenólicos presentes no lúpulo e a atividades antimicrobianas dos mesmos (KOWALCZYK et al., 2016; BAJIĆ et al., 2019)

Os filmes F2/10/LB e F2/controle não apresentaram diferenças significativas para a atividade antioxidante por DPPH e ABTS.

O aumento da concentração dos extratos de lúpulo LB e LU nos filmes refletiu no aumento da atividade antioxidante em ambos os testes realizados, DPPH e ABTS. Kowalczyk et al., (2016) aplicaram extrato etanólico de lúpulo em filmes de carboximetilcelulose, amido de batata oxidado, proteína isolada de soja e gelatina em diferentes proporções e também observaram maior atividade antioxidante em relação a maior quantidade de extrato aplicado nos filmes.

Bajić et al., (2019) estudou filmes de quitosana adicionados de diferentes concentrações de extrato de lúpulo obtido por extração por fluido supercrítico e observando um aumento significativo no teor de compostos fenólicos totais com a maior proporção de extrato de lúpulo adicionados aos filmes, compostos esses que possuem atividade antioxidante.

Os filmes com extrato LU se mostraram mais eficientes quanto a atividade antioxidante para DPPH e ABTS, quando comparados com LB em todas as concentrações testadas. Pode-se observar também que os resultados para o extrato puro (Tabela 3; Capítulo 3) foram maiores em relação aos filmes mesmo na maior concentração aplicada dos dois extratos (LB e LU).

Os resultados eficazes da atividade antioxidante são atribuídos aos compostos presentes nos lúpulos, quercetina, isoquercetina entre outros compostos fenólicos, que possuem a capacidade de retardar ou desacelerar a oxidação de um material oxidável (SHI et al., 2019; ARON et al., 2012; KROFTA et al., 2008).

Os resultados foram satisfatórios para a aplicação da formulação F2 adicionada dos extratos LB e LU, como uma embalagem com propriedades antioxidantes para alimentos.

4. CONCLUSÃO

Foram produzidas quatro formulações de filmes finos a partir da combinação de QTS, PVA e sorbitol, adicionadas com 10, 20 e 40 % dos extratos de LB e LU em cada uma das formulações. Os filmes com apenas QTS e sorbitol se apresentaram mais hidrofóbicos, porém, mais rígidos. As formulações contendo PVA tiveram maior alongação e maior afinidade com a água. Desta forma a formulação F2 (70% quitosana (QTS)/ 30% poli(álcool vinílico) (PVA) e 10% sorbitol (SBT)) foi a escolhida para realizar as demais análises. Os filmes expressaram a cor amarela e quanto maior a adição de extrato, maior a variação da cor em relação aos controles. A interação entre os polímeros e a adição dos extratos nos filmes foram observadas nas análises de TGA e de DSC. A atividade antioxidante para os filmes contendo lúpulo LB e LU sugere que os mesmos podem ser utilizados como embalagem ativa em alimentos com a finalidade inibir a oxidação.

REFERÊNCIAS

ARON, P. M.; TING, P.L.; SHELLHAMMER, T. H. HPLC-ESI-MS Identification of hop-derived polyphenols that contribute antioxidant capacity and flavor to beer. In: QIAN, M. C.; SHELLHAMMER, T. H., editors. **Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages**. p. 217–234, 2012.

BARON, R. D.; PÉREZ, L. L.; SALCEDO, J. M.; PÉREZ, L.; ANARAL, O. J. Production and characterization of films based on blends of chitosan from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste and pectin from orange (*Citrus sinensis* Osbeck) peel, **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 98, p. 676-683, 2017.

BAJIĆ, M.; JALŠOVEC, H.; TRAVAN, A.; NOVAK, U.; LIKOZAR, B. Chitosan-based films with incorporated supercritical CO₂ hop extract: Structural, physicochemical, and antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v.219, p.261-268, 2019.

BLAND, J. S.; MINICH, D.; LERMAN, R.; DARLAND, G.; LAMB, J.; TRIPP, M.; GRAYSON, N. Isohumulones from hops (*Humulus lupulus*) and their potential role in medical nutrition therapy. **Pharma Nutrition**. v. 3, p. 46–52, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.,E.; BERSER, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant. **LWT- Food Science and Technology**. v. 28, p. 25–30, 1995.

CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANI, C. L.; LINO, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINI, I. C.; OGLIARI, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 278–285, 2013.

CHEN, Q.; CABANAS-POLO, S.; GOUDOURI, O. M.; BOCCACCINI, A. R. Electrophoretic co-deposition of polyvinyl alcohol (PVA) reinforced alginate–Bioglass® composite coating on stainless steel: Mechanical properties and in-vitro bioactivity assessment. **Materials Science and Engineering**. v. 40, p. 55-64, 2014.

FUSSYA, Z.; PATZAKC, J.; STEHLIKB, J.; MATOUSEK, J. Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. **Journal of Plant Physiology**. v. 170, p. 688–695, 2013.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agentes. **European Journal of Cancer**. v. 41, p. 1941–1954, 2005 a.

GERHAUSER, C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 49, p. 827–31, 2005b.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

KARABIN, M.; HUDCOVA, T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 1063–1090, 2015.

KOWALCZYK, D.; ŚWIECA M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103–110, 2013.

LIU, Y.; WANG, S.; LAN, W. Fabrication of antibacterial chitosan-PVA blended film using electrospray technique for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules** v.107, p. A848-854, 2018.

MACHADO, M. H. Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos. 2017. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

MACHOVÁ, E.; KVAPILOVA, K.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin–glucan complex from *Aspergillus niger*. **Ultrasonics sonochemistry**. v. 5, n. 4, p. 169-172, 1999.

MARIA, T. M. C.; CARVALHO, R. A.; SOBRA, P. J. A.; *, HABITANTE, A. M. B. Q.; SOLORZA-FERIA, J. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. **Journal of Food Engineering**. v. 87, p. 191–199, 2008.

MIHINDUKULASURIYA, S.D.F.; LIM, L.-T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MUJTABA, M.; MORSI, R. E.; KERCH, G.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; KHAWAR, K. M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.121 , p.889–904, 2019.

NEAMTU, I.; CHIRIAC, A.P.; NITA, L.E.; BERCEA, M.; STOLERIU, A. Investigation of poly (aspartic acid)/vinyllic polymer interpolymer complex. **Journal of optoelectronics and advanced materials**, v. 9, n. 4, p. 981-984, 2007.

OTONI, C. G.; ESPITIA, P. J. P.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. **Food Research International**, v. 83, p. 60–73, 2016.

PARPARITA, E.; CHEABURU, C. N.; VASILE, C. Morphological, thermal and rheological characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends. **Cellulose Chem. Technol**, v. 46, p. 571-581, 2012.

PRIYADARSHI, R.; SAURAJ, KUMAR, B.; DEEBA, F.; KULSHRESHTHA, A.; NEGI, Y. S. Chitosan films incorporated with Apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. **Food Hydrocolloids**, v.85, p.158–166, 2018.

QUIHUI-COTA, L.; MORALES-FIGUEROA, G.G.; VALBUENA-GREGORIO, E.; CAMPOS-GARCÍA, J.; SILVA-BELTRÁN, N.P.; LÓPEZ-MATA, M.A. Membrane of chitosan with essential oils of romero and tree of tea: potential as biomaterial, **Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica**. v. 38, p.255-264, 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**. v. 26, p. 1231–1237, 1999

SILVA, P. H A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, p. 902-906, 2008.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. **Phytochemistry**. v. 65, p.1317–1330, 2004.

TEUBER, M.; SCHMALRECK, A. F. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. **Archives of Microbiology**. v. 94, p. 159-171, 1973.

TROUILLAS, P.; CALLISTEA, C.; ALLAISC, D.; SIMONB, A.; MARFAKA, A.; DELAGEB, C.; DUROUXA, J. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. **Food Chemistry**. v. 80, p. 399–407, 2003.

YOSHIDA, C.M.P.; BASTOS, C.E.N.; FRANCO, T.T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 584-589, 2010.

YOSHIDA, C.M.P.; OLIVEIRA, E.N.; FRANCO, T.T. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

DA ROSA, CLEONICE GONÇALVES DA. Síntese e caracterização de nanopartículas de zeína carregadas com óleos essenciais para aplicação em filmes nanocompósitos de poli (óxido etileno). 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

SHI, G. J.; LI, Y.; CAO, Q. H.; WU, H. X.; TANG, X.Y.; GAO, X. H.; YU, J. Q.; CHEN, Z.; YANG. Y. In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against

diabetes and its complications: A systematic review of the literature. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1085–1099, 2019.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 160–166. 2008.

PARPARITA, E.; CHEABURU, C. N.; VASILE, C. Morphological, thermal and rheological characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends. **Cellulose Chem. Technol.**, v. 46, p. 571–581, 2012.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. **Carbohydrate polymers**, v. 48, n. 2, p. 179–190, 2002.

ROTTA, J., OZÓRIO, R. Á., KEHRWALD, A. M., DE OLIVEIRA BARRA, G. M., AMBONI, R. D. D. M. C., BARRETO, P. L. M. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 619–623, 2009.

CANEVAROLO Jr, S.V. Técnicas de caracterização de polímeros. **Editora Artliber** - São Paulo, 2004.

LI, J.; ZIVANOVIC, S.; DAVIDSON, P. M.; KIT, K. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p.786–791, 2010.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10205–10214, 2006.

SEBTI, I., CHOLLET, E., DEGRAEVE, P., NOEL, C., PEYROL, E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 693–699, 2007.

PINOTTI, A., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N. E. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 1, p. 66-72, 2007.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2007. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2007.

LEWANDOWSKA, Katarzyna. Influence of molecular weight on structure and rheological properties of microcrystalline chitosan mixtures. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 583-586, 2015.

HOU, Z., ZHANG, M., LIU, B., YAN, Q., YUAN, F., XU, D., GAO, Y. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 205-211, 2012.

MARTINEZ, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Steady-shear rheology of concentrated chitosan solutions. **Journal of Texture studies**, v. 35, n. 1, p. 53-74, 2004.

YOSHIDA, C.M.P.; BASTOS, C.E.N.; FRANCO, T.T. Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 584-589, 2010.

YOSHIDA, C.M.P.; OLIVEIRA, E.N.; FRANCO, T.T. Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 3, p. 161-170, 2009.

GIORDANO, F.; NOVAK, C.; MOYANO, J. R. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. **Thermochimica Acta**, v. 380, n. 2, p. 123-151, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes considerações podem ser feitas:

- ✓ DCCR utilizado para determinar os melhores parâmetros de extração por ultrassom dos CFT do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Brasil (LB), mostraram resultados com boa repetitividade, o que permitiu obter as condições ótimas para a extração.
- ✓ Para as análises de caracterização físico-química, determinação de CFT, flavonoides e atividade antioxidante as amostras apresentaram diferença significativa, sendo que para todos esses experimentos o LB se destacou em relação ao LU pois apresentou maior teor destes compostos.
- ✓ Ambas as amostras foram eficientes contra as bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e não apresentaram atividade antimicrobiana para a bactéria Gram negativa *Escherichia coli*.
- ✓ Os principais compostos do óleo essencial dos lúpulos, brasileiro (OLB) e dos EUA (OLU), foram *trans*- β -farnesene, β -selinene, mirceno, α -selinene, α -humulene e β -cariofileno.
- ✓ Os compostos fenólicos predominantes na planta do lúpulo (LB e LU), foram ácido protocatecuico, isoquercetina e ácido ferúlico, já para os extratos (seco e líquido) foram os flavonoides, isoquercetina e quercetina. Sendo assim a extração foi mais eficiente para os flavonoides o que pode ser confirmado pelo alto valor observado para TFT nos extratos.
- ✓ Quando comparada a atividades antioxidantes testadas do extrato de lúpulo (LB e LU) com os óleos essenciais das mesmas plantas, os extratos se destacaram positivamente.
- ✓ Das quatro formulações preparadas com diferentes proporções dos polímeros a formulação F2 foi escolhida, F2 (70% quitosana (QTS)/ 30% poli(álcool vinílico) (PVA) e 10% sorbitol (SBT)), por apresentar melhor propriedades mecânicas e menor ângulo de contato com a água.
- ✓ Os filmes se mostraram adequados para filmes poliméricos finos, quanto as demais análises de caracterização.
- ✓ A atividade antioxidante, dos filmes contendo LU se destacaram em comparação com os contendo LB.

Anexo

Anexo I - Parâmetros do espectrômetro de massa e tempo de retenção dos compostos fenólicos testados na amostra de extrato de lúpulo da variedade Cascade por LC-MS / MS.

Composto fenólico	Tempo de retenção (min)	[M – H] ⁻ /produtos ion <i>m/z</i>	PD	PE	PEC	EC	PXC
Ácido gálico	4.0	168.8/124.1	-25.0	-11.0	-12.0	-20.0	-4.0
Ácido protocatecuico	6.9	153.0/109.0	-26.0	-9.0	-17.3	-17.0	-4.0
Ácido Mandélico	7.8	150.8/106.8	-20.0	-7.5	-10.0	-12.0	-2.0
Epigallocatequina	8,2	304.8/124.9	-40.0	-5.5	-38.0	-30.0	-14.0
Catequina	8.8	288.8/120.3	-55.0	-4.5	-14.0	-34.0	-4.0
Ácido 4 – hidroximetilbenzóico	8.8	150.8/104.2	-30.0	-6.5	-10.0	-18.0	-2.0
Ácido clorogênico	9.2	352.8/187.8	-25.0	-5.0	-24.0	-28.0	-2.0
Epicatequina	9.4	288.9/122.3	-290.0	-4.0	-16.0	-40.0	-2.0
Ácido cafeico	9.4	178.8/131.3	-30.0	-11.0	-10.0	-22.0	-2.0
Ácido vanílico	9.6	166.8/148.5	-30.0	-7.0	-10.0	-18.0	-2.0
Ácido siríngico	10.0	196.8/119.6	-30.0	-10.5	-12.0	-28.0	-2.0
Fustin	10.3	286.8/105.6	-45.0	-4.0	-14.0	-38.0	-2.0
Vanilina	10.4	150.8/132.8	-25.0	-3.0	-14.0	-14.0	-2.0
Ácido <i>p</i> - cumarico	10.4	163.0/119.0	-21.0	-4.0	-17.7	-13.0	-6.0
Ácido 4-aminobenzoico	10.5	135.8/90.5	-20.0	-9.5	-10.0	-16.0	-2.0
Ácido metoxifenilacético	10.5	164.9/118.7	-10.0	-10.0	-10.0	-6.0	-2.0
Taxifolina	10.7	302.8/120.7	-95.0	-10.5	-16.0	-30.0	-2.0
Rutina	10.7	609.1/301.0	-31.0	-5.0	-34.2	-27.0	-6.0
Ácido ferúlico	10.7	192.8/129.7	-40.0	-7.0	-10.0	-24.0	-2.0
Siringaldeido	10.7	180.8/163.1	-25.0	-4.5	-10.0	-20.0	-4.0
Umbeliferona	10.8	160.8/129.5	-55.0	-4.5	-10.0	-22.0	-4.0
Ácido rosmarínico	10.8	358.9/159.8	-50.0	-3.0	-18.0	-28.0	-4.0
Isoquercetina	10.8	462.9/297.3	-245.0	-3.0	-48.0	-44.0	-2.0
Quercetina	10.8	301.0/149.3	-80.0	-6.0	-14.0	-32.0	0.0
Ácido sinápico	10.9	222.8/161.6	-30.0	-12.0	-16.0	-22.0	0.0
Ácido salicílico	11.0	136.9/91.1	-25.0	-2.5	-10.0	-24.0	-2.0
Escopoletina	11.0	190.7/172.8	-35.0	-4.0	-12.0	-14.0	-2.0

Resveratrol	11.1	226.9/181.6	-50.0	-8.5	-18.0	-24.0	-4.0
Naringina	11.2	579.9/150.0	-250.0	-4.0	-36.0	-52.0	-2.0
Miricetina	11.2	316.9/150.6	-65.0	-4.5	-18.0	-34.0	-2.0
Aromadendrin	11.3	286.8/123.9	-45.0	-4.0	-16.0	-32.0	-2.0
Coniferaldeído	11.3	176.8/160.3	-25.0	-10.0	-12.0	-20.0	-2.0
Ácido <i>p</i> -anisico	11.3	150.8/105.2	-25.0	-5.0	-10.0	-18.0	-2.0
Sinapaldeído	11.4	206.9/174.4	-30.0	-3.0	-12.0	-22.0	-2.0
4- metilumbeliferona	11.5	174.8/130.5	-45.0	-10.5	-10.0	-28.0	-2.0
Ácido elágico	11.7	300.8/142.5	-50.0	-10.5	-16.0	-58.0	0.0
Ácido cinâmico	11.8	146.8/100.7	-25.0	-9.0	-10.0	-16.0	-2.0
Eriodictiol	11.8	286.8/132.1	-75.0	-9.5	-16.0	-36.0	-4.0
Kaempferol	12.3	284.8/62.6	-75.0	-4.5	-16.0	-62.0	-2.0
Naringenina	12.4	270.8/150.2	-60.0	-4.5	-12.0	-28.0	-2.0
Apigenina	12.6	268.7/114.8	-75.0	-9.0	-14.0	-46.0	-2.0
Hispidulina	12.7	298.8/282.7	-50.0	-7.0	-22.0	-14.0	-4.0
Galangina	13.4	268.8/59.9	-75.0	-8.5	-16.0	-64.0	-10.0
Pinocembrina	13.6	254.9/60.7	-60.0	-12.0	-22.0	-54.0	-2.0
Chrysin	13.9	252.8/62.2	-65.0	-10.0	-20.0	-52.0	-2.0
Carnosol	14.2	329.0/284.0	-75.0	-5.0	-16.0	-16.0	-4.0

PD - Potencial de Desaceleração; PE - Potencial de Entrada; PEC - Potencial de Energia de Colisão; EC - Energia de Colisão; PXC - Potencial de Saída da Célula de Colisão. Adaptado de Schulz et al. (2015).