

**ANÁLISE DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) CASCADE E CHINOOK CULTIVADOS SOB CLIMA TROPICAL NO ESTADO DE SÃO PAULO****Beatriz C. de Souza<sup>a,\*</sup>, Daniele R. Contin<sup>a</sup>, Paulo Cezar Vieira<sup>b</sup> e Fernando B. Da Costa<sup>a,\*</sup>**<sup>a</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto – SP, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Ciências BioMoleculares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 16/06/2023; aceito em 22/08/2023; publicado na web 10/10/2023

ANALYSIS OF VOLATILE OILS FROM CASCADE AND CHINOOK HOPS (*Humulus Lupulus* L.) CULTIVATED UNDER TROPICAL CLIMATE IN THE STATE OF SÃO PAULO. Hop (*Humulus lupulus* L.) is a plant widely used as raw material in global beer production, valued for its aroma, flavor and bittering components. Despite Brazil's third-place position in global beer production, the country still relies on imported hops. Thus, this study describes the chemical composition and volatile oil content of Cascade and Chinook hop cultivars grown in a tropical area in São Paulo state during 2020 and 2021, as well as imported commercial pellets. Hydrodistillation was employed to extract the oils, which were analyzed using GC-FID and GC-MS techniques. Approximately 40% of the cultivated hop plants exhibited volatile oil content within the expected range. Among the 55 identified compounds,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -caryophyllene, and  $\alpha$ -humulene were the major constituents, and several key compounds contributing to hop aroma were detected. Principal component analysis revealed distinct clustering patterns based on cultivar and harvest year. This study reports the first comparative analysis of hops harvested in different years and the volatile oil composition and content of Chinook hops cultivated in Brazil, making a significant contribution to the fields of agronomy and national beer market. These findings highlight Brazil's potential to become a major hop producer by implementing proper management practices and suitable technologies.

Keywords: *Humulus lupulus*; volatile oil; gas chromatography; tropicalization.**INTRODUÇÃO****O lúpulo**

A espécie *Humulus lupulus* L. é uma planta perene conhecida no mundo todo como uma das matérias-primas na fabricação de cerveja. Ela é popularmente conhecida como lúpulo e pertence à família Cannabaceae, da ordem Rosales. A planta é uma trepadeira que brota de rizomas, podendo atingir até 9 m de comprimento, e dioica, ocorrendo nas formas masculina e feminina em indivíduos diferentes, facilmente distinguíveis pela anatomia de suas flores, sendo que apenas as plantas femininas são utilizadas no processo de fabricação da cerveja.<sup>1</sup>

As inflorescências da planta feminina quando maduras formam os cones, onde ocorrem os tricomas glandulares, conhecidos como glândulas de lupulina, responsáveis pela biossíntese e armazenamento dos metabólitos secundários do lúpulo.<sup>2</sup> Os cones secos representam a principal parte comercializada da planta e a partir da trituração e compactação deles são obtidos os *pellets*, a forma mais utilizada na indústria cervejeira.<sup>3</sup>

**Contribuição dos óleos voláteis**

Os cones de lúpulo são caracterizados por uma mistura única e complexa de metabólitos secundários, incluindo aquelas do seu óleo volátil. Três classes de metabólitos são de particular relevância em relação à intensidade de amargor na cerveja: prenilchalconas, prenilflavanonas e prenilfloroglucínóis, também conhecidos como ácidos amargos, divididos em  $\alpha$ -ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona) e  $\beta$ -ácidos (lupulona, colupulona e adlupulona).

Enquanto o principal papel dos ácidos amargos é proporcionar amargor, aumentar o tempo de conservação da cerveja e estabilizar sua espuma, os óleos voláteis representam a fração responsável por conferir ao lúpulo seu odor característico, contribuindo assim com o aroma e sabor da cerveja.<sup>4</sup>

O lúpulo seco pode conter de 0,5 a 3,0% de óleo volátil, podendo haver mais de 1.000 substâncias diferentes na sua composição, classificadas tradicionalmente em três principais grupos químicos: hidrocarbonetos, compostos oxigenados e organossulfurados.<sup>5</sup> O grupo dos hidrocarbonetos pode ser classificado em monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos e, dentre eles, destacam-se os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -farneseno, além do monoterpeno  $\beta$ -mirceno, que pode representar de 30 a 60% da composição total dos óleos voláteis. Já entre os compostos oxigenados, o mais abundante é o linalol, um produto da hidratação do  $\beta$ -mirceno. Os organossulfurados estão presentes em baixas proporções nos óleos, e geralmente são responsáveis por causar um sabor indesejável na cerveja.<sup>6</sup>

O teor e a composição dos óleos voláteis de lúpulo dependem de fatores intrínsecos, como a diferença genética entre cultivares diferentes, o fator mais decisivo, e extrínsecos, como condições de crescimento e secagem, maturação dos cones, idade da planta e armazenamento do material coletado, entre outros.<sup>7</sup>

Para a produção de cerveja, os lúpulos de cultivares diferentes são classificados em três grupos de acordo com sua composição química: (i) lúpulos de aroma, que contribuem com o odor; (ii) lúpulos de amargor, que contribuem com mais amargor no paladar; e (iii) lúpulos de função dupla, que contribuem tanto com o odor quanto com maior amargor, sendo que atualmente existem centenas de cultivares diferentes disponíveis para uso em fabricação de cerveja.<sup>8</sup>

\*e-mail: febcosta@fcfrp.usp.br

## Importância econômica e cenário atual da produção de lúpulo no Brasil

Apesar de aproximadamente 97% do lúpulo cultivado em todo o mundo destinar-se para a produção de cerveja, a planta possui importantes atividades na redução de sintomas leves de depressão, ansiedade e estresse, anti-carcinogênica, anti-inflamatória, antioxidante e anti-microbiana, mostrando um amplo uso nos setores das indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos.<sup>9,10</sup>

O lúpulo é cultivado na maioria das regiões de clima temperado, localizadas entre as latitudes 35° e 55°. A produção mundial é dominada pela Alemanha e pelos EUA, sendo estes responsáveis por cerca de 70% das exportações totais e mais de 60% da área de lúpulo sob cultivo.<sup>11,12</sup> Recentemente a Etiópia tem sido considerada também como um país importante na produção de lúpulo, no entanto, este país produz o *Rhamnus prinoïdes* L'Hér. (Rhamnaceae), que tem um potencial uso como substituto do lúpulo, sendo usado na produção de uma cerveja etíope conhecida como *tella*.<sup>13</sup>

É possível observar no Brasil uma tendência crescente na produção de cerveja nos últimos anos, alcançando o patamar de 14 bilhões de litros por ano em 2018, conferindo-lhe o terceiro lugar no ranking mundial, atrás apenas da China e dos EUA, o que explica a significativa participação do segmento cervejeiro na economia nacional, com média de 1,6% de participação no PIB anual, faturamento de R\$ 100 bilhões por ano e geração de 2,7 milhões de empregos no país.<sup>14</sup>

O interesse dos brasileiros por cervejas mais refinadas tem impulsionado a expansão do mercado nacional de cervejas artesanais, tendo sido registrado um aumento de 74% no número de cervejarias entre 2018 e 2021, sendo a maioria nas regiões Sul e Sudeste do país.<sup>15</sup> No entanto, quase 100% do lúpulo utilizado na fabricação de cerveja no Brasil ainda é importado. Apenas nos últimos 5 anos, entre 2018 e 2022, o Brasil importou 19.284 toneladas em produtos de lúpulo (extratos, cones, *pellets*, etc.), principalmente dos EUA e da Alemanha, totalizando um gasto de mais de 329 milhões de dólares.<sup>16</sup>

Isso ocorre porque, devido às diferentes condições ambientais entre o clima tropical brasileiro e o clima temperado do Hemisfério Norte, acreditava-se não ser possível cultivar a planta no Brasil. Estudos agrônômicos recentes revelam que além da temperatura, o fotoperíodo também influencia na produtividade dos cones, já que no verão do Hemisfério Norte a planta tem disponível cerca de 16 h diárias de luz natural e, no Brasil, pode chegar até 14 h. Este problema pode ser contornado com a instalação de placas de iluminação artificial no local de cultivo, a fim de proporcionar suplementação luminosa e aumentar a produtividade.<sup>17,18</sup>

Com o avanço das tecnologias e do agronegócio, o cenário atual do cultivo de lúpulo no país tem mudado, com um aumento significativo de 110% na área de produção nacional entre 2020 e 2021, atingindo 42 hectares e uma produção de 24 toneladas em 2020. Se a produção anual continuar aumentando, futuramente poderá influenciar nos custos da fabricação da cerveja nacional, assim como na produção de novos sabores e aromas na cerveja, gerando maior renda para produtores, mais empregos, ganhos para a indústria cervejeira e para o próprio consumidor final.<sup>19,20</sup>

Por fim, o número de pesquisas e publicações científicas com o lúpulo cultivado no país vêm crescendo nos últimos anos.<sup>21-29</sup> No entanto, até o momento, ainda não há um entendimento claro sobre o perfil dos compostos voláteis dos lúpulos cultivados em clima tropical no Brasil, uma vez que essa descrição ainda não foi feita de forma detalhada.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo e a comparação quali e quantitativa da composição química dos compostos voláteis presentes em cones de dois cultivares diferentes de

lúpulo, Cascade e Chinook, cultivados sob clima tropical em Ribeirão Preto, SP e de *pellets* comerciais dos mesmos cultivares.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material vegetal e processamento

O material vegetal (*H. lupulus* L.) utilizado neste trabalho foi dividido em: (i) cones secos de lúpulo dos cultivares Cascade e Chinook cultivados em Ribeirão Preto, SP, e (ii) *pellets* comerciais de lúpulo dos cultivares Cascade e Chinook importados dos EUA (ambos da safra de 2021, Yakima Chief Hops®, Washington, EUA). No total, foram analisados 13 indivíduos de lúpulo cultivados, sendo seis Cascade e sete Chinook, e dois pacotes de 50 g de *pellet* comercial, um de cada cultivar.

O cultivo de lúpulo foi realizado no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, SP, no campus da Universidade de São Paulo (USP) (21° 10' 05.5" S, 47° 50' 48.3" W). Foram selecionados os cultivares Cascade, de aroma herbal, cítrico, floral e gramíneo, e Chinook, com aroma de pinheiro, cítrico, tropical e frutado, que se tratam de dois cultivares desenvolvidos nos EUA, já adaptados ao ambiente do meio-Atlântico e bastante utilizados nas cervejarias, sendo os mais cultivados atualmente no Brasil.

As mudas dos diferentes indivíduos de cada cultivar foram adquiridas da empresa Hops Brasil (Cedral, SP, Brasil), registrados e autorizados para comercialização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As mudas permaneceram em estufas e foram transferidas para o campo de cultivo em novembro de 2019. As coletas dos cones foram realizadas nos períodos de floração da planta em 2020 e 2021. Em seguida, o material foi seco em estufa a temperatura ambiente com ar circulante até atingir 10% de umidade e em seguida armazenados em sacos plásticos com *zip lock* em freezer a -20 °C e protegidos da luz até a realização das análises. Uma excisada de cada cultivar foi depositada no Herbário SPFR, sob os números 17781 para Chinook e 17782 para Cascade.

De acordo com a classificação de Köppen-Geiger, o clima nesta região é classificado como tropical, com invernos moderadamente frios e secos e verões quentes e úmidos. A temperatura média nos anos de 2020 e 2021 foi de 25,5 e 24,5 °C, respectivamente, enquanto a precipitação total foi de 173,0 e 153,2 mm, respectivamente.

Os cones de lúpulo cultivados foram triturados em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, IKA-Werke) apenas no momento da extração. Os *pellets* comerciais foram triturados em moinho analítico e liofilizados para remoção de umidade.

### Extração dos óleos e cálculo do teor de óleo

A extração de óleo volátil das diferentes amostras foi realizada utilizando-se a técnica de hidrodestilação em aparato de Clevenger seguindo o método preconizado pela *American Society of Brewing Chemists* (ASBC),<sup>30</sup> utilizando menor quantidade de amostra (aproximadamente 50 g de cada). Inicialmente, o material foi pesado e transferido para balão de fundo redondo de 2.000 mL, preenchido até a metade da capacidade com água destilada e acoplado em aparato de Clevenger, tendo sido preenchida também a coluna do condensador. Em seguida, o balão foi aquecido com o uso de uma manta aquecedora, regulando-se a temperatura de forma que gotejasse de 25 a 35 gotas min<sup>-1</sup> do condensador. O processo durou 4 h e a quantidade de óleo adquirida foi usada para realizar os cálculos dos teores de óleo volátil de cada amostra, sendo relatado em volume de óleo em mL por 100 g de massa do material extraído, armazenando os óleos em *vials* de vidro a -20 °C ao abrigo da luz até as análises.

## Perfil químico dos óleos voláteis

### Análise quantitativa por CG-DIC

A semi-quantificação dos componentes principais dos óleos obtidos foi realizada seguindo a metodologia preconizada pela ASBC utilizando o 2-octanol como padrão interno.<sup>31</sup> As amostras foram diluídas a 10% (v/v) com uma solução 1% (v/v) de 2-octanol em heptano e analisadas em duplicata por cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chama (CG-DIC, modelo 6890N, Agilent Technologies) com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% fenil-metil-siloxano, 30 m, 0,32 mm, 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O volume de injeção foi de 1 µL com uma razão split de 50:1. O hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C, mantida por 1 min, subindo até 180 °C a uma taxa de aquecimento de 2 °C min<sup>-1</sup>, depois até 280 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a do detector 260 °C.

Além das amostras de óleo volátil, para realizar a identificação foram analisadas nas mesmas condições soluções de 1 mg L<sup>-1</sup> de três padrões analíticos dos componentes majoritários dos óleos de lúpulo: β-mirceno, β-cariofileno (ambos Sigma-Aldrich) e α-humuleno (Phytolab).

### Análise qualitativa por CG-EM

Os óleos obtidos foram diluídos na proporção de 1:25 em hexano e analisados por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM, modelo GC-MS-QP-2010, Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna usada foi uma capilar ZB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm, Zebron) e o método foi adaptado de acordo com o proposto por Adams.<sup>32</sup> Um volume de 1 µL de cada amostra foi injetado utilizando razão split de 1:80 e temperatura do injetor a 230 °C, e o hélio foi usado como gás de arraste. A temperatura inicial da corrida foi de 60 °C, subindo até 240 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C min<sup>-1</sup>. A ionização eletrônica foi de 70 eV e o espectrômetro de massas detectou razões massa/carga de 40 a 500 m/z.

A análise qualitativa das principais substâncias foi realizada através do cálculo dos índices de retenção linear (IRL),<sup>33</sup> calculados usando como referência uma série homóloga de alcanos de C8 a C20 analisada sob as mesmas condições. Assim, os índices juntamente com os espectros de massas foram comparados com dados das bibliotecas NIST, Wiley e FFNSC na tentativa de identificar as substâncias.

### Análise estatística multivariada

Os dados das áreas das substâncias obtidos nas análises por CG-EM das amostras foram inseridos em planilha eletrônica no programa Microsoft Excel (2019, Microsoft Corporation®, EUA), e exportados para o software Matlab (R2022b, MathWorks)<sup>34</sup> para realizar a análise estatística multivariada. Os dados foram autoescalados (centrados na média e divididos pelo desvio padrão) na etapa de processamento para dar o mesmo peso a todas as variáveis, e posteriormente aplicada a técnica de análise exploratória não supervisionada de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Comparação dos teores de óleo volátil das amostras

Na Tabela 1 são apresentados os teores de óleo volátil para os diferentes indivíduos dos cultivares Cascade e Chinook das coletas de 2020 e 2021 e dos *pellets*.

A faixa de teor de óleo volátil descrita para o cultivar Cascade

varia de 0,7 a 2,5% e a do Chinook de 1,0 a 2,7%.<sup>35</sup> Para os lúpulos Cascade que foram cultivados, dois indivíduos das coletas de 2021 apresentaram teor dentro do esperado. Já para os lúpulos Chinook, um indivíduo da coleta de 2020 e dois da coleta de 2021 apresentaram teor dentro da faixa esperada.

Entre os indivíduos coletados, foi possível observar um expressivo aumento no teor de óleo volátil da segunda coleta de 2021 em relação à de 2020. Entre os indivíduos coletados nos diferentes anos, quase todos do cultivar Chinook, ou seis dos sete, apresentaram teores maiores que os indivíduos Cascade para ambos os anos, o que era esperado de acordo com o teor relatado para ambos cultivares.

Vale lembrar que os teores e a composição de óleo volátil dependem de vários fatores intrínsecos, como as diferenças genéticas entre lúpulos de diferentes cultivares, além de fatores extrínsecos durante o crescimento da planta, como as condições de crescimento, momento da colheita/maturação dos cones, condições de secagem e de armazenamento, entre outros.<sup>6</sup>

No caso dos indivíduos cultivados neste trabalho, é importante salientar que as plantas que foram analisadas tinham menos de três anos de plantio (*baby hops*), fator que pode influenciar na produção de óleo volátil devido ao fato de ainda não terem idade suficiente para produzir teores dentro do que é esperado.<sup>36</sup> Neste contexto, foi possível observar que as plantas coletadas do ano de 2021 apresentaram teores de óleo significativamente maiores do que as da coleta de 2020 (primeira safra das plantas), evidenciando a influência da idade da planta nos dados obtidos.

**Tabela 1.** Teor de óleo volátil das diferentes amostras dos cones e *pellets* de lúpulo

Amostra	Teor de óleo (mL 100 g <sup>-1</sup> )	Média ± DP (mL 100 g <sup>-1</sup> )
I-Cas-20-1	0,48	
I-Cas-20-2	0,26	0,39 ± 0,12
I-Cas-20-3	0,44	
I-Cas-21-1	0,86	
I-Cas-21-2	0,66	0,79 ± 0,11
I-Cas-21-3	0,84	
I-Chi-20-1	0,82	
I-Chi-20-2	0,74	
I-Chi-20-3	1,00	0,85 ± 0,11
I-Chi-20-4	0,82	
I-Chi-21-1	1,71	
I-Chi-21-2	1,68	1,43 ± 0,47
I-Chi-21-3	0,89	
P-Cas	1,16	-
P-Chi	1,60	-

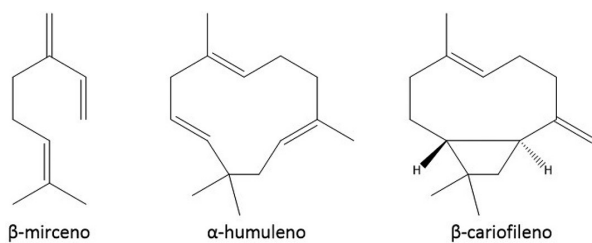
I: indivíduo cultivado. P: *pellet* comercial. Cas: cultivar Cascade. Chi: cultivar Chinook. 20: coleta de 2020. 21: coleta de 2021. DP: desvio padrão.

### Análise dos perfis químicos

Em relação às análises por CG-EM, foi realizada a identificação de mais de 90% da área total dos picos dos cromatogramas analisados, todas no nível 2 de confiança segundo a Iniciativa de Padronização em Metabolômica (anotação com base em bancos de dados de espectros de massas).<sup>37</sup> Os nomes das substâncias identificadas nos óleos estão apresentados na Tabela 2.

Ao todo, foram anotadas 55 substâncias diferentes, sendo a maioria da classe dos ésteres (14), monoterpenos (9) e sesquiterpenos (27).

Dentre as 55, 13 estavam presentes em todas as amostras analisadas, a saber: propionato de isopentila,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, isobutirato de isopentila, limoneno,  $\beta$ -felandreno, geranato de metila,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -muroleno,  $\alpha$ -selineno,  $\delta$ -cadineno e epóxido de humuleno.



**Figura 1.** Estrutura química dos metabólitos secundários majoritários do óleo volátil de lúpulo desenhadas no ChemDraw (20.0.0.41, PerkinElmer Informatics©)<sup>2</sup>

Os dados das análises adquiridas por CG-DIC (Tabela 1S, material suplementar) mostraram que os metabólitos majoritários presentes em todas as amostras foram o monoterpene  $\beta$ -mirceno e os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno (Figura 1), conforme descrito na literatura.<sup>6</sup>

A PCA é uma ferramenta que auxilia a identificar as informações mais importantes dentro de um conjunto de dados mediante a criação de novas variáveis ortogonais, chamadas de “componentes principais” (PCs), que descrevem uma variabilidade grande do sistema analisado, podendo ajudar a encontrar similaridades entre amostras, detectar outliers, identificar tendências, agrupamentos ou padrões em um conjunto de dados complexo. Enquanto o gráfico de *scores* representa o grau de similaridade entre as amostras, a avaliação do gráfico de *loadings* permite entender quais variáveis ou metabólitos foram responsáveis pelos agrupamentos observados no gráfico de *scores*.<sup>38,39</sup>

Assim, é imprescindível analisar o gráfico de *scores* e *loadings* em conjunto, porque a presença de uma dada amostra em um determinado

**Tabela 2.** Caracterização química dos óleos voláteis dos cones e pellets de lúpulo por CG-EM

ID	Substância	IRL		Média $\pm$ DM das áreas relativas das substâncias (%)*				P-Cas	P-Chi
		Exp.	Lit.	I-Cas-2020	I-Chi-2020	I-Cas-2021	I-Chi-2021		
Ésteres									
1	isobutirato de isobutila	910	914	-	0,03 $\pm$ 0,04	-	0,16 $\pm$ 0,06	0,09	0,21
3	propionato de isopentila	966	972	0,04 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,29	0,12	0,18
6	isobutirato de isopentila	1013	1013	0,18 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,52	0,16 $\pm$ 0,06	1,65 $\pm$ 0,66	0,66	2,42
7	heptanoato de metila	1020	1027	0,10 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,12	-	-
11	6-metil-heptanoato de metila	1084	1068	0,15 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,34	0,06 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,50	-	0,67
15	isovalerato de amila	1108	1108	-	0,12 $\pm$ 0,12	-	0,17 $\pm$ 0,12	-	0,39
16	octanoato de metila	1122	1125	0,10 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,08	0,08 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,06	-	-
17	6-metil-octanoato de metila	1191	1189	-	0,41 $\pm$ 0,25	-	0,81 $\pm$ 0,37	-	0,59
18	nonanoato de metila	1222	1224	0,12 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,15	-	-
21	geranato de metila	1320	1321	0,33 $\pm$ 0,1	0,44 $\pm$ 0,33	0,13 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,23	0,47	0,94
22	decanoato de metila	1323	1325	-	0,17 $\pm$ 0,09	-	0,20 $\pm$ 0,05	-	0,09
26	acetato de geranila	1377	1377	0,58 $\pm$ 0,12	-	0,25 $\pm$ 0,06	-	1,50	-
31	propionato de geranila	1468	1473	-	-	0,12 $\pm$ 0,05	-	1,36	-
41	isobutirato de geranila	1507	1515	0,57 $\pm$ 0,18	0,21 $\pm$ 0,31	0,11 $\pm$ 0,11	-	2,99	-
Monoterpenos									
2	$\alpha$ -pineno	930	932	-	-	-	0,02 $\pm$ 0,03	0,09	0,05
4	$\beta$ -pineno	977	978	0,38 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,09	0,71 $\pm$ 0,11	0,54 $\pm$ 0,13	0,47	0,33
5	$\beta$ -mirceno	987	988	41,38 $\pm$ 7,42	28,98 $\pm$ 8,19	70,14 $\pm$ 7,14	34,41 $\pm$ 9,09	34,09	19,14
8	limoneno	1028	1028	0,16 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04	0,48	0,21
9	$\beta$ -felandreno	1029	1030	0,08 $\pm$ 0,08	0,03 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,03	0,19	0,10
10	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	1042	1045	-	-	-	-	0,12	-
12	perileno	1098	1102	0,11 $\pm$ 0,03	-	-	-	0,23	0,09
13	linalol	1099	1098	0,09 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,04	-	0,07 $\pm$ 0,10	0,78	0,42
19	geraniol	1248	1249	-	-	-	0,07 $\pm$ 0,05	0,79	0,60
Sesquiterpenos									
23	$\alpha$ -cubebeno	1345	1348	-	0,07 $\pm$ 0,07	-	0,07 $\pm$ 0,05	-	-
24	$\alpha$ -ylangeno	1367	1368	-	0,07 $\pm$ 0,07	-	0,07 $\pm$ 0,09	-	0,36
25	$\alpha$ -copaeno	1373	1375	0,13 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,11	-	0,56 $\pm$ 0,20	0,39	1,45
27	$\beta$ -cariofileno	1416	1418	8,88 $\pm$ 0,71	11,85 $\pm$ 2,11	5,16 $\pm$ 1,22	9,91 $\pm$ 1,91	8,75	10,35
28	$\beta$ -copaeno	1426	1428	0,27 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,26	0,06 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,24	-	0,63
29	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1431	1433	0,34 $\pm$ 0,01	-	0,12 $\pm$ 0,01	-	0,56	-
30	$\alpha$ -humuleno	1452	1452	26,7 $\pm$ 3,15	28,67 $\pm$ 5,15	17,95 $\pm$ 5,52	22,36 $\pm$ 4,40	28,02	19,97
32	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1468	1473	-	0,18 $\pm$ 0,18	-	0,49 $\pm$ 0,17	-	0,81

**Tabela 2.** Caracterização química dos óleos voláteis dos cones e *pellets* de lúpulo por CG-EM (cont.)

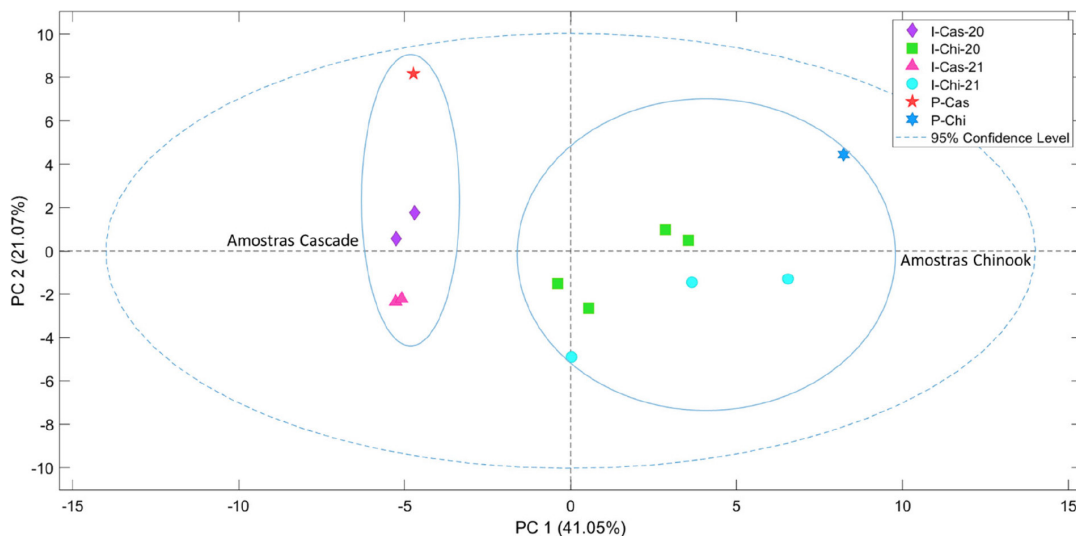
ID	Substância	IRL		Média ± DM das áreas relativas das substâncias (%)*				P-Cas	P-Chi
		Exp.	Lit.	I-Cas-2020	I-Chi-2020	I-Cas-2021	I-Chi-2021		
Sesquiterpenos									
33	γ-muroloeno	1471	1473	0,91 ± 0,21	2,14 ± 0,56	0,09 ± 0,09	1,99 ± 0,68	1,02	3,57
34	α-amorfeno	1476	1482	-	0,10 ± 0,10	-	0,13 ± 0,09	-	0,37
35	β-selineno	1485	1485	2,17 ± 0,71	1,55 ± 0,23	0,95 ± 0,22	1,30 ± 0,40	1,95	1,99
36	cis-α-farneseno	1489	1489	0,21 ± 0,04	-	-	-	-	-
37	β-guaieno	1489	1491	-	0,36 ± 0,12	-	0,45 ± 0,19	0,18	0,87
38	α-selineno	1492	1494	2,56 ± 0,61	2,15 ± 0,27	1,06 ± 0,30	1,75 ± 0,28	2,19	1,97
40	α-muroloeno	1495	1499	-	0,73 ± 0,16	0,07 ± 0,07	0,71 ± 0,30	-	1,43
42	γ-cadineno	1509	1508	0,69 ± 0,12	2,40 ± 0,43	0,27 ± 0,06	2,30 ± 0,83	-	4,76
43	δ-cadineno	1515	1515	1,03 ± 0,02	3,67 ± 0,87	0,51 ± 0,12	3,60 ± 0,98	1,65	5,75
44	epizonarene	1517	1502	-	-	-	0,24 ± 0,16	-	0,60
45	cis-calameneno	1518	1517	-	0,30 ± 0,25	-	0,08 ± 0,11	0,19	0,35
46	cubebeno (cadina-1,4-dieno)	1529	1529	-	0,20 ± 0,11	-	0,49 ± 0,15	-	0,76
47	α-cadineno	1533	1533	0,05 ± 0,05	1,48 ± 0,11	-	1,39 ± 0,37	0,15	3,01
48	selina-3,7(11)-diene	1537	1538	-	1,20 ± 0,07	-	1,17 ± 0,38	-	2,38
49	germacreno B	1554	1552	-	1,51 ± 0,57	-	1,03 ± 0,37	-	-
52	1- <i>epi</i> -cubenol	1623	1625	-	0,03 ± 0,04	-	0,04 ± 0,06	-	0,22
53	τ-cadinol	1637	1635	0,09 ± 0,09	0,39 ± 0,14	-	0,30 ± 0,20	0,15	0,71
54	α-eudesmol	1650	1650	-	0,77 ± 0,10	-	0,68 ± 0,24	-	1,30
55	farnesol	1712	1713	-	0,59 ± 0,35	-	0,54 ± 0,38	-	0,40
Outros									
14	nonanal	1104	1104	0,33 ± 0,05	-	-	-	-	-
20	2-undecanona	1291	1291	0,27 ± 0,13	0,12 ± 0,06	-	0,10 ± 0,06	0,34	0,27
39	2-tridecanona	1494	1497	0,78 ± 0,28	-	-	-	1,00	-
50	óxido de cariofileno	1577	1581	1,18 ± 0,34	0,44 ± 0,12	-	0,07 ± 0,09	1,00	0,36
51	epóxido de humuleno II	1605	1606	2,15 ± 0,72	0,96 ± 0,30	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,20	1,82	0,80

Exp.: média dos índices calculados. Lit.: índice da literatura. I: indivíduo cultivado. P: *pellet* comercial. Cas: Cascade. Chi: Chinook. DM: desvio médio. \*Média da porcentagem dos picos presentes nos diferentes indivíduos do mesmo cultivar e ano.

quadrante do gráfico de *scores* será explicada pela presença de seus respectivos metabólitos no mesmo quadrante do gráfico de *loadings*.

Na Figura 2 está representado o gráfico de *scores* com as duas primeiras componentes principais da PCA realizada com os dados das

amostras de óleo volátil e analisadas por CG-EM. A PC1 corresponde a 41% da variância da matriz de dados e a PC2, 21% assim, ambas as PCs explicam 62% da variabilidade presente no conjunto de dados, permitindo a observação de uma tendência de agrupamento das



**Figura 2.** Gráfico de *scores* com as duas primeiras PCs da PCA realizada com as amostras de óleo volátil de cones e de *pellets* analisadas por CG-EM

amostras de acordo com o cultivar e o ano de coleta. A PC1 separou melhor as amostras de cultivares diferentes, enquanto a PC2 separou melhor os indivíduos cultivados dos *pellets* comerciais, e indivíduos de diferentes anos de coletas. Os *pellets* se separaram mais das outras amostras de cones, mas cada um no quadrante onde os indivíduos de seus respectivos cultivares se agruparam.

O gráfico de *loadings* é apresentado na Figura 3, representando todos os metabólitos presentes na Tabela 2, e permitindo detectar as substâncias responsáveis pelo agrupamento das amostras no gráfico de *scores* (Figura 2), sendo que a PC1, no eixo X, explica uma variância maior dos dados. Assim, analisando os dados da PCA juntamente com o percentual de cada substância presente na Tabela 2, foi possível inferir que os metabólitos **5**, **13**, **14**, **26**, **29** e **31** (identificação presente na primeira coluna da Tabela 2) foram os maiores responsáveis pelo agrupamento das amostras de cultivar Cascade no quadrante da esquerda, todos presentes em níveis mais altos nessas amostras, enquanto que as substâncias **14**, **26**, **29** e **31** estavam presentes apenas nos indivíduos e *pellets* de Cascade, podendo ser indicados como possíveis marcadores deste cultivar. Já a substância **5** estava presente em maiores níveis nos indivíduos de Cascade coletados do que no respectivo *pellet* analisado.

Já no quadrante da direita, onde as amostras do cultivar Chinook se agruparam, os metabólitos **16**, **25** e **27** foram os maiores responsáveis pelo agrupamento das amostras, além das substâncias **15**, **17**, **22**, **23**, **24**, **32**, **34**, **46**, **48**, **52**, **54** e **55**, as quais estavam presentes apenas em amostras do cultivar Chinook.

Neste contexto, estudos utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a olfatométrie (GC-O), que separa os compostos voláteis concomitantemente com a avaliação sensorial e caracterização aromática destes compostos por avaliadores, mostraram que os sesquiterpenos oxigenados, como o **52**, **54** e **55**, todos exclusivos das amostras de cultivar Chinook, eluíam quando um intenso odor amadeirado de cedro era percebido, além de serem atribuídos a eles sabores herbais.<sup>40</sup>

Compostos que contribuem com odores florais do óleo de lúpulo incluem o linalol (**13**), com odor agradável floral e de laranja, o geraniol (**19**) com odor floral-rosa, de gerânio, e o acetato de geranila (**26**), presente apenas nas amostras de Cascade, com um odor perfumado de pinheiro e floral. Já o isobutirato de geranila (**41**),

presente em baixas concentrações nas amostras, é um metabólito que pode ser hidrolisado por leveduras na fabricação de cerveja para produzir geraniol livre.<sup>41</sup>

O monoterpeno  $\beta$ -mirceno (**5**) é considerado um composto chave na contribuição para o aroma do lúpulo, com um odor resinoso, de pinheiro e ervas característico.<sup>42</sup> Além disso, ele é o precursor de vários outros compostos de aroma impactantes, como o linalol. Já entre os sesquiterpenos,  $\alpha$ -cubebeno (**23**),  $\beta$ -cariofileno (**27**) e  $\beta$ -selineno (**35**) apresentam notas herbais, de especiarias e amadeiradas. Além disso, foi demonstrado por Su e Yin<sup>43</sup> que  $\beta$ -mirceno (**5**), linalol (**13**), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (**29**),  $\alpha$ -humuleno (**30**) e octanoato de metila (**16**), este último presente apenas nos indivíduos cultivados, podem ser considerados alguns dos odorantes mais potentes presentes em óleos voláteis de lúpulo, indicando suas contribuições potenciais para o aroma típico da planta.

Vale mencionar que os achados sobre o perfil químico das amostras de cultivar Cascade deste trabalho divergem dos relatados por Almeida *et al.*,<sup>23</sup> principalmente para o indivíduo cultivado no Brasil, que teve o *trans*- $\beta$ -farneseno como metabólito majoritário, seguido de  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -cariofileno e 2-undecanona. Já o perfil da amostra de *pellets* comerciais teve maior semelhança com o analisado no nosso trabalho, mostrando altos teores de  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -mirceno e  $\beta$ -cariofileno. Essas diferenças encontradas podem ser devido ao diferente local de plantio, manejo, ou até pelo tempo de extração dos óleos, de 7 h, apesar do tipo de amostras comparadas ter sido o mesmo (cones cultivados com *pellets* comerciais).

Essas diferenças nos teores de alguns metabólitos são responsáveis por proporcionar o aroma característico de cada cultivar de lúpulo, que são escolhidos pelos cervejeiros de acordo com o perfil sensorial desejável para seu produto. Todavia, é importante salientar que nem todos os compostos presentes no óleo essencial do lúpulo são encontrados na cerveja devido ao processo de fervura do mosto, apesar de haver uma boa correlação.<sup>41</sup>

Para entender melhor o perfil aromático dos lúpulos cultivados em Ribeirão Preto neste trabalho em seu principal produto final, a cerveja, foi realizado um estudo no qual foram produzidas cervejas artesanais com o material local e com material importado dos EUA (cones de lúpulo Cascade e Chinook). O objetivo foi explorar o impacto da origem destes cultivares de lúpulos (Brasil e EUA) na

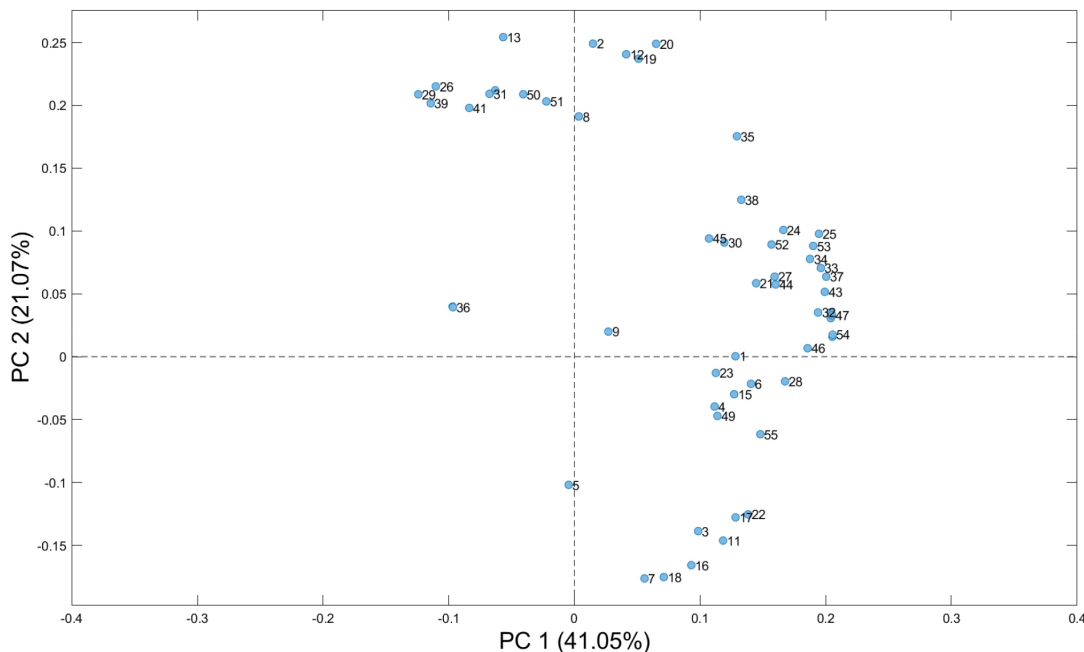


Figura 3. Gráfico de *loadings* com as duas primeiras PCs da PCA realizada com as amostras de óleo volátil de cones e de *pellets* analisadas por CG-EM

avaliação sensorial de consumidores altamente envolvidos com cervejas artesanais. Trata-se do primeiro artigo publicado com cerveja artesanal elaborada com lúpulo cultivado no Brasil, revelando que a origem do lúpulo afetou a avaliação sensorial e hedônica dos participantes. Neste estudo, as amostras produzidas com lúpulo cultivado localmente receberam pontuações mais altas na avaliação, tendo sido notado também um papel importante do sexo/gênero na percepção sensorial e na influência das informações de origem do lúpulo. Desta forma, os resultados do estudo realizado são de suma importância tanto para os produtores de cerveja artesanal como para os produtores de lúpulo nacional.<sup>44</sup>

Por fim, a diferença encontrada entre os perfis químicos das amostras de óleo volátil de cultivares distintos foi maior do que a diferença entre os perfis de indivíduos cultivados no Brasil para *pellets* comerciais, sugerindo que a escolha da variedade de lúpulo utilizada pode ter um impacto tão significativo quanto ou até maior nas características sensoriais da cerveja do que a origem geográfica dos lúpulos.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho descreveu a composição química e o teor dos óleos voláteis obtidos de diferentes amostras de lúpulo dos cultivares Cascade e Chinook coletados nos anos de 2020 e 2021 no estado de São Paulo, bem como de *pellets* comerciais, através da extração por hidrodestilação e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Os resultados mostraram que quase 40% dos indivíduos de lúpulo cultivados apresentaram teor de óleo volátil dentro da faixa esperada, demonstrando um potencial na produção de óleo de acordo com o desenvolvimento da planta ao longo dos meses. Além disso, as análises do perfil químico das amostras obtidas por CG-EM permitiram a identificação de 55 substâncias diferentes, com o teor de metabólitos majoritários conforme descrito na literatura, e detecção de compostos chave na contribuição para o aroma do lúpulo. A análise de componentes principais, que explicou 62% da variabilidade do conjunto de dados, permitiu a observação de uma tendência de agrupamento das amostras de acordo com o cultivar e o ano de coleta.

Em relação ao estudo, existem limitações que devem ser consideradas para pesquisas futuras, como o tipo de processamento da planta, já que as amostras de lúpulo disponíveis comercialmente e usadas nas cervejarias são em sua maioria de lúpulos pelletizados, algo que sugerimos ser abordado em pesquisas futuras, além da inclusão de outras variedades de lúpulo.

Este é o primeiro relato sobre a composição química e teor de óleo volátil de lúpulos do cultivar Chinook cultivados no estado de São Paulo, e o primeiro a mostrar a comparação entre lúpulos coletados em diferentes anos no Brasil, fornecendo assim uma contribuição significativa para a química de óleos voláteis de lúpulo, o campo da agronomia e o mercado cervejeiro nacional, além de revelar o potencial do Brasil em se tornar um forte produtor de lúpulo, com o manejo adequado e uso de tecnologias inovadoras.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

O material suplementar desse trabalho está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br/>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo

nº 2019/01486-0, com bolsas à B. C. S. (2019/21325-1) e D. R. C. (2019/11175-2), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 308141/2019-9. Além disso, os autores agradecem ao Prof. Norberto P. Lopes e à técnica Izabel C. C. Turatti, do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP, pela disponibilização do equipamento de cromatografia gasosa e auxílio nas análises, além de agradecer ao Prof. Edener E. P. Filho, do Grupo de Análise Instrumental Aplicada do Departamento de Química da UFSCar, pela informação difundida em quimioinformática.

## REFERÊNCIAS

- Zanoli, P.; Zavatti, M.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 383. [Crossref]
- Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E. K.; Becker, T.; *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 289. [Crossref]
- Santos, H. M. M.; Veiga, F. J. B.; de Pina, M. E. T.; de Sousa, J. J. M. S.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2004**, *40*, 455. [Crossref]
- Bocquet, L.; Sahpaz, S.; Hilbert, J. L.; Rambaud, C.; Rivière, C.; *Phytochem. Rev.* **2018**, *17*, 1047. [Crossref]
- Roberts, M. T.; Dufour, J. P.; Lewis, A. C.; *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 473. [Crossref]
- Durello, R. S.; Silva, L. M.; Bogusz Junior, S.; *Quim. Nova* **2019**, *42*, 900. [Crossref]
- Sharp, D. C.; Townsend, M. S.; Qian, Y.; Shellhammer, T. H.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2014**, *72*, 231. [Crossref]
- Duarte, L. M.; Amorim, T. L.; Grazul, R. M.; de Oliveira, M. A. L.; *Food Res. Int.* **2020**, *138*, 109768. [Crossref]
- Astray, G.; Gullón, P.; Gullón, B.; Munekata, P. E. S.; Lorenzo, J. M.; *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 5074. [Crossref]
- Sun, S.; Wang, X.; Yuan, A.; Liu, J.; Li, Z.; Xie, D.; Zhang, H.; Luo, W.; Xu, H.; Liu, J.; Nie, C.; Zhang, H.; *Food Energy Secur.* **2022**, *11*, 1. [Crossref]
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, acessado em Setembro 2023.
- OECD, <https://oec.world/en/profile/hs/hops>, acessado em Setembro 2023.
- Zewdu, G. A.; Tsehail, B. A.; *J. Microbiol., Biotechnol. Food Sci.* **2022**, *12*, 4710. [Crossref]
- Serviços e Informações do Brasil (gov.br), <https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/08/mercado-cervejeiro-cresce-no-brasil-e-aumenta-interesse-pela-producao-nacional-de-lupulo-e-cevada>, acessado em Setembro 2023.
- Serviços e Informações do Brasil (gov.br), <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/arquivos/anuario-da-cerveja-2021.pdf>, acessado em Setembro 2023.
- Comex Stat, <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/39550>, acessado em Setembro 2023.
- Bauerle, W. L.; *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16003. [Crossref]
- Agrolúpulo, <https://www.aprolupulo.com.br/blog/iluminacao-artificial-no-cultivo-de-lupulo>, acessado em Setembro 2023.
- Agrolúpulo, <https://aprolupulo.com.br/estatisticas>, acessado em Setembro 2023.
- Epagri, <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/08/05/producao-de-lupulo-em-campo-alegre>, acessado em Setembro 2023.
- Almeida, A. R.; Maciel, M. V. O. B.; Machado, M. H.; Bazzo, G. C.; de Armas, R. D.; Vitorino, V. B.; Vitali, L.; Block, J. M.; Barreto, P. L. M.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 340. [Crossref]
- da Silva, R. G.; Almeida, T. C.; Reis, A. C. C.; Filho, S. A. V.; Brandão, G. C.; da Silva, G. N.; de Sousa, H. C.; de Almeida, V. L.; Lopes, J. C. D.; de Souza, G. H. B.; *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 5918. [Crossref]
- Almeida, A. R.; Maciel, M. V. O. B.; Gandolpho, B. C. G.; Machado, M. H.; Teixeira, G. L.; Bertoldi, F. C.; Noronha, C. M.; Vitali, L.; Block, J. M.; Barreto, P. L. M.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2020**, *79*, 156. [Crossref]

24. Veiga, B. A.; Hamerski, F.; Clausen, M. P.; Errico, M.; Scheer, A. P.; Corazza, M. L.; *J. Supercrit. Fluids* **2021**, *170*, 105155. [Crossref]
25. Simieli, M. B.; Gazola, R. P. D.; Pagliarini, M. K.; Vargas, P. F.; de Castilho, R. M. M.; *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e127101320863. [Crossref]
26. Sartori, L. O.; Souza, A. A.; Bragagnolo, F. S.; Fortuna, G. C.; Bonfim, F. P. G.; Sarnighausen, V. C. R.; Carneiro, R. L.; Funari, C. S.; *Food Chem.* **2022**, *373*, 131323. [Crossref]
27. dos Santos, F. C.; dos Santos, M.; Huezsmann, R. D.; Ceola, D.; de Souza, E. M. D.; dos Santos Junior, C. F.; Guidolin, A. F.; Coimbra, J. L. M.; *J. Agric. Sci.* **2022**, *14*, 198. [Crossref]
28. Silva, J. V. N.; Teixeira, B. C. S.; Santos, L. L.; Guimarães, A. C. G.; Gomes, J. A. S.; Gomes, M. S.; *Brazilian Journal of Development* **2022**, *8*, 66076. [Crossref]
29. Fortuna, G. C.; Gomes, J. A. O.; Campos, O. P.; Neves, C. S.; Bonfim, F. P. G.; *Cienc. Rural* **2023**, *53*, 8. [Crossref]
30. American Society of Brewing Chemists Methods of Analysis (ASBC); *Hops 13: Total Essential Oils in Hops and Hop Pellets by Steam Distillation*, ASBC, St. Paul, 2010. [Link] acessado em Setembro 2023
31. American Society of Brewing Chemists Methods of Analysis (ASBC); *Hops 17: Hop Essential Oils By Capillary Gas Chromatography-Flame Ionization Detection*, ASBC, St. Paul, 2004. [Link] acessado em Setembro 2023
32. Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4<sup>th</sup> ed.; Allured Pub Corp: Illinois, 2007, cap. 3.
33. Van Den Dool, H.; Kratz, P. D.; *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463. [Crossref]
34. *Matlab*<sup>®</sup>, version R2022b; The MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2023.
35. Beer Maverick, <https://beermaverick.com/hops/>, acessado em Setembro 2023.
36. Jelínek, L.; Dolečková, M.; Karabin, M.; Hudcová, T.; Kotlíková, B.; Dostálek, P.; *Czech J. Food Sci.* **2012**, *30*, 541. [Crossref]
37. Blaženović, I.; Kind, T.; Ji, J.; Fiehn, O.; *Metabolites* **2018**, *8*, 31. [Crossref]
38. Pilon, A. C.; Selegato, D. M.; Fernandes, R. P.; Bueno, P. C. P.; Pinho, D. R.; Carnevale Neto, F.; Freire, R. T.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2020**, *43*, 329. [Crossref]
39. de Souza, A. M.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 223. [Crossref]
40. Eyres, G.; Marriott, P. J.; Dufour, J. P.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1150*, 70. [Crossref]
41. Eyres, G.; Dufour, J. P. Em *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. R., ed.; Academic Press: Cambridge, 2008, cap. 22. [Crossref]
42. Rettberg, N.; Biendl, M.; Garbe, L. A.; *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2018**, *76*, 1. [Crossref]
43. Su, X.; Yin, Y.; *Food Chem.* **2021**, *364*, 130410. [Crossref]
44. Cassago, A. L. L.; Artêncio, M. M.; Contin, D. R.; de Souza, B. C.; Dias, G. S.; Gobbo Neto, L.; Giralaldi, J. M. E.; da Costa, F. B.; *International Journal of Wine Business Research* **2023**, no prelo. [Crossref]