

**Avaliação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos
em 3 variedades de lúpulos comerciais de aroma e 3 de amargor**

**Evaluation of antioxidant activity and content of phenolic compounds
in 3 varieties of commercial flavoring hops and 3 bittering hops**

DOI:10.34117/bjdv8n10-085

Recebimento dos originais: 05/09/2022

Aceitação para publicação: 06/10/2022

João Victor Nunes Silva

Mestrado em Biotecnologia

Instituição: Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de
Uberlândia Campus Patos de Minas

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 230, Centro, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-128

E-mail: joao0581@hotmail.com

Bruna Cássia da Silva Teixeira

Mestranda em Biotecnologia

Instituição: Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de
Uberlândia Campus Patos de Minas

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 230, Centro, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-128

E-mail: brunacassia@ufu.br

Letícia Luzia Santos

Graduado em Engenharia de Alimentos

Instituição: Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de
Uberlândia Campus Patos de Minas

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 230, Centro, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-128

E-mail: lericialusantos@ufu.br

Ana Clara Garcia Guimarães

Doutorado em Ciências dos Alimentos

Instituição: Departamento de Nutrição - Centro Universitário de Patos
de Minas (UNIPAM)

Endereço: R. Major Gote, 808, Caiçaras, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-207

E-mail: anaclaragg@unipam.com

Júlia Ariana de Souza Gomes

Doutorado em Farmacologia

Instituição: Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
Campus Patos de Minas

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 230, Centro, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-128

E-mail: julia.lenzi@ufu.br

Marcos de Souza Gomes

Doutorado em Agroquímica

Instituição: Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia

Campus Patos de Minas

Endereço: Av. Getúlio Vargas, 230, Centro, Patos de Minas - MG, CEP: 38700-128

E-mail: marcos.gomes@ufu.br

RESUMO

O lúpulo é uma planta pertencente à família *Cannabaceae* do gênero *Humulus*. Possui fitoquímicos como resinas, óleos essenciais e compostos fenólicos presentes em sua composição que podem auxiliar no controle do estresse oxidativo. Diante disso o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antioxidante de 3 variedades de aroma (East Kent Golding, Sladek e Cascade) e 3 de amargor (Galena, Sorachi Ace e Columbus Zeus) por meio das metodologias DPPH, ABTS, Redução do complexo fosfomolibdênio, Poder Redutor, e os compostos fenólicos por Folin Ciocalteu. Os extratos foram preparados com 0,2g de lúpulo peletizado e 100 mL de água sob fervura por 60 minutos para as variedades de amargor e 5 minutos para as de aroma. As análises estatísticas foram feitas sob delineamento inteiramente casualizado por teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os resultados por DPPH e ABTS demonstraram maior atividade antioxidante de East Kent, Galena e Cascade sob as demais variedades, o ensaio de fosfomolibdênio revelou maiores atividades antioxidantes expressas por East Kent, Cascade e Sorachi, já o poder redutor revelou maior atividade antioxidante das variedades East Kent, Sorachi e Galena. Columbus e Sladek exibiram menor atividade antioxidante do que as demais pela maioria dos testes. East Kent, Galena e Cascade exibiram os maiores valores de fenólicos totais. A equivalência com o padrão BHT ranqueou a atividade antioxidante na ordem do maior para o menor, East Kent, Galena, Cascade, Sorachi, Columbus e Sladek. Não foi possível relacionar o tipo de variedade com a atividade antioxidante, logo ela parece não depender do tipo da variedade.

Palavras-chave: *Humulus lupulus*, óleos essenciais, compostos fenólicos, fitoquímica, antioxidantes, alfa ácidos.

ABSTRACT

Hops is a plant belonging to the *Cannabaceae* family of the genus *Humulus*. It has phytochemicals such as resins, essential oils and phenolic compounds present in its composition that can help in the control of oxidative stress. Therefore, the objective of the present work is to evaluate the antioxidant activity of 3 aroma varieties (East Kent Golding, Sladek and Cascade) and 3 bitterness varieties (Galena, Sorachi Ace and Columbus Zeus) using the DPPH, ABTS, Reduction of the complex Phosphomolybdenum, Reducing Power, and Phenolics by Folin Ciocalteu. The extracts were prepared with 0.2g of pelleted hops and 100 mL of boiling water for 60 minutes for the bitter varieties and 5 minutes for the aroma varieties. Statistical analyzes were performed under a completely randomized design by Scott-Knott test at 5% probability. The results by DPPH and ABTS showed greater antioxidant activity of East Kent, Galena and Cascade over the other varieties, the phosphomolybdenum assay revealed greater antioxidant activities expressed by East Kent, Cascade and Sorachi, while the reducing power revealed greater antioxidant activity of the East Kent varieties, Sorachi and Galena. Columbus and Sladek exhibited lower antioxidant activity than the others by most tests. East Kent, Galena and Cascade exhibited the highest values of total phenolics. The equivalence with the BHT standard ranked the antioxidant activity in the order East Kent,

Galena, Cascade, Sorachi, Columbus and Sladek. It was not possible to relate the type of variety with the antioxidant activity, so it does not seem to depend on the type of the variety.

Keywords: *Humulus lupulus*, essential oils, phenolic compounds, phytochemistry, antioxidants, alpha acids.

1 INTRODUÇÃO

O lúpulo é uma planta perene e dioica que cresce em forma de trepadeira. Essa planta faz parte da família *Cannabaceae* que contém três espécies marcantes de lúpulo que são: *H. lupulus*, *H. yunnanensis* e *H. japonicus*. Dentre elas destacam-se a primeira e a terceira com relevância de produção para a indústria cervejeira, visto que aproximadamente 97% do lúpulo produzido mundialmente é destinado para a produção de cerveja, embora ele apresente propriedades terapêuticas interessantes (DURELLO; SILVA; BOGUZS., 2019). O interesse da indústria no lúpulo se dá pela presença de fitoquímicos que conferem características muito importantes para a cerveja, com destaque para as resinas, óleos essenciais e compostos fenólicos (ALMAGUER *et al.*, 2014; SHARPE, LAWS, 1981; GORIS *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo, o qual é marcado por um desequilíbrio entre defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas, possibilita que esses radicais danifiquem estruturas de biomoléculas, condição essa bastante estudada e ligada a inúmeros distúrbios humanos (PIZZINO *et al.*, 2017). O lúpulo pode contribuir significativamente no combate ao estresse oxidativo, visto que ele é fonte de antioxidantes exógenos como os compostos fenólicos, que são potentes antioxidantes e até mesmo xantohumol e os óleos essenciais que já exibiram atividade antioxidante em diversos trabalhos (KROFTA, MIKYSKA, HASKOVÁ, 2008; LIU *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2016).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho é determinar o teor de compostos fenólicos totais pelo método da redução do radical Folin Ciocalteu, bem como avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos provenientes de 3 variedades comerciais de lúpulos de aroma e 3 de amargor por meio de metodologias de DPPH, ABTS, Redução do complexo fosfomolibdênio e Poder Redutor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES

As 6 amostras de lúpulo foram adquiridas em mais de um estabelecimento especializado na comercialização de produtos para a fabricação de cerveja. 3 variedades de amargor Columbus Zeus, Sorachi Ace e Galena; 3 variedades de aroma Cascade, East Kent Golding e Sladek. Elas estavam na forma de *pellets*, simulando como se faz em uma linha de produção cervejeira. De posse dos lúpulos peletizados realizou-se um acondicionamento no refrigerador durante a realização das análises em uma temperatura de 4°C, a fim de manter a qualidade das amostras e evitar perdas significativas nos fitoquímicos de interesse.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para a preparação dos extratos, foram pesados em balança analítica 0,2 g do lúpulo seco peletizado de todas as variedades. Após isso, em um erlenmeyer, 100 mL de água foi submetido ao processo de ebulição, por ação do bico de Bunsen. Com o início da fervura a massa de lúpulo foi adicionada e o sistema ficou em ebulição por 60 minutos para as variedades de amargor e durante 5 minutos para os lúpulos de aroma. Situação essa semelhante a realizada na produção da cerveja industrial. Em seguida, cada extrato foi armazenado no ultrafreezer a -80 °C até o início das análises químicas.

2.3 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.3.1 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,50 mL dos extratos de lúpulo com 2,5 mL de 0,2 mol L⁻¹ do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L⁻¹) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg mL⁻¹) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.3.2 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz *et al.* (2008), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição dos extratos de lúpulo 1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Para a comparação das atividades, o padrão BHT (hidroxitolueno butilado) foi avaliado nas concentrações 1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS^{•+}.

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes *et al.* (2010). Para o ensaio foram misturados 10 μL dos extratos de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 990 μL da solução do radical ABTS^{•+}. A absorbância foi monitorada espectrofotometricamente a 735 nm, durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS^{•+} atuou como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} (AA%) pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo

A_{Am} = Absorbância da amostra

Os valores de atividade antioxidante dos extratos foram comparados com o padrão BHT nas concentrações 1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio foi realizado conforme (PRIETO *et al.*, 1999). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução dos reagentes (ácido sulfúrico 0,6M; fosfato de sódio 28mM e molibdato de amônio 4mM). Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 695 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.5 Avaliação da atividade antioxidante por meio da metodologia do Poder Redutor

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do poder redutor foi realizada de acordo com a metodologia de Oyaizu (1986). 100 μL do extrato de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram misturadas com 1 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 1 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%. Após 20 minutos de incubação a 50°C, 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura, sendo essa agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada foi adicionada e 600 μL de cloreto férrico 0,1%. As leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (7 x 5), sendo (6 extratos do lúpulo e o antioxidante padrão BHT) e 5 concentrações (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 3 repetições. Já para o teor de fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 6 tipos de extratos (3 repetições). O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem antioxidante e absorvância em relação às concentrações analisadas para os testes DPPH e ABTS; Complexo Fosfomolibdênio e Poder Redutor, respectivamente. Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de equivalentes ao ácido gálico, expressos em miligramas de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MEDIDA POR MÉTODO DPPH

Os valores de atividade antioxidante observados por meio do método DPPH referentes ao padrão e as amostras das 6 variedades de lúpulo estão dispostos na Tabela 1 que reflete o gráfico exposto na Figura 1.

Figura 1 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão BHT pelo método DPPH. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

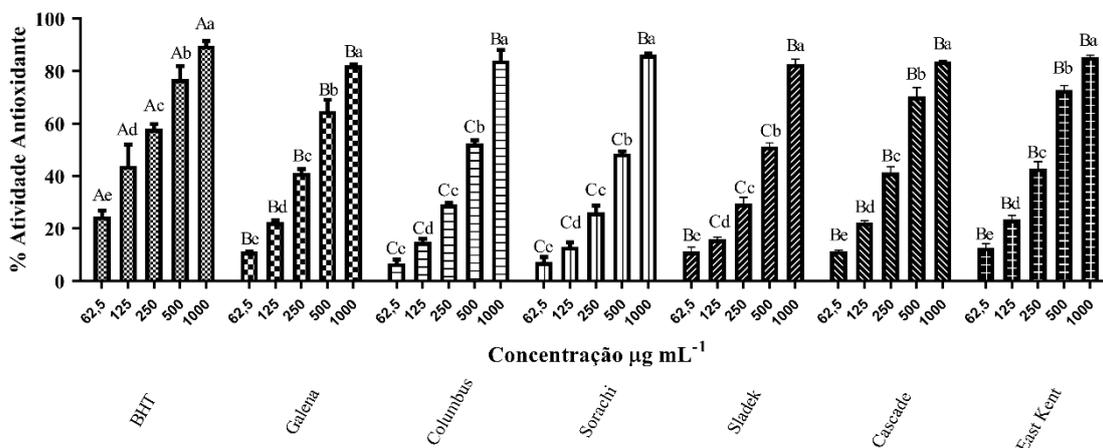


Tabela 1. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão BHT pelo método DPPH.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	11,21 Be	22,50 Bd	41,20 Bc	64,84 Bb	82,21 Ba
Columbus	6,81 Ce	14,88 Cd	29,19 Cc	52,33 Cb	84,08 Ca
Sorachi	7,20 Ce	13,10 Cd	26,10 Cc	48,58 Cb	86,17 Ca
Sladek	11,32 Be	16,00 Cd	29,46 Cc	51,30 Cb	82,71 Ba
Cascade	11,44 Be	22,30 Bd	41,39 Bc	70,39 Bb	83,82 Ba
East Kent	12,72 Be	23,49 Bd	42,92 Bc	72,88 Bb	85,42 Ba
BHT	24,66 Ac	43,99 Ad	58,08 Ac	76,96 Ab	89,71 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

O maior valor foi obtido pela variedade Sorachi (86,17%) na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o menor valor foi apresentado pela variedade Columbus (6,81%) na concentração de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os demais resultados de atividade antioxidante foram bastante variados dentro das faixas de concentração e entre as variedades e o padrão.

Foi possível observar que houve diferenças significativas na porcentagem de atividade antioxidante entre as variedades e entre as diferentes faixas de concentração de uma mesma variedade. Diante disso, nenhum extrato aquoso foi capaz de exibir uma atividade antioxidante superior ao padrão BHT, analisando na mesma faixa de concentração. Logo este foi superior a todas as amostras independente se a variedade do lúpulo foi de amargor ou de aroma. As variedades Galena, Cascade e East Kent foram ligeiramente superiores às variedades Columbus e Sorachi na faixa de concentração 62,5

a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ nenhuma das amostras exibiu diferenças estatisticamente significativas.

Quando analisadas as faixas de concentração dentro de cada extrato e do padrão

Observou-se que o aumento da concentração acarretou em um aumento na atividade antioxidante, tanto no padrão BHT quanto nas variedades de amargor e aroma. Logo as porcentagens de atividade antioxidante proporcionados pelos extratos aquosos das amostras e do padrão são significativamente menores na menor faixa de concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do que na faixa de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, mantendo essa situação até a faixa de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Krofta e colaboradores (2008) mediram a atividade antioxidante dos extratos de diversas variedades de lúpulo comercializadas em todo o mundo ao longo dos anos de 2005 a 2006. Os autores evidenciaram que os maiores valores de atividade antioxidante, entre 70 a 80%, foram obtidos das variedades Saaz e Spalter Select, as quais são classificadas como variedades de aroma (Hopslit., 2018). As demais variedades exibiram valores de atividade antioxidante que variaram entre 40 a 60%. Esses resultados, quando comparados aos do presente trabalho, corroboram com a hipótese de que o potencial antioxidante não está ligado ao tipo de variedade, visto que, apesar dos dois valores de atividade antioxidante mais expressivos serem provenientes de 2 variedades de aroma, houve outras de amargor que superaram variedades de aroma.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MEDIDA POR MÉTODO ABTS

Os valores de atividade antioxidante medidos por ABTS nas diferentes concentrações e variedades estão representados pela Tabela 2, a qual reflete o gráfico exposto na Figura 2. Foi possível alcançar 100% de atividade antioxidante no padrão a partir da concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, e nas amostras, esse valor foi observado na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a variedade Galena.

Além disso, valores mais expressivos de atividade antioxidante nessa mesma concentração apareceram para as variedades Cascade e East Kent, 99,21% e 99,47% respectivamente, a ponto de não serem diferentes estatisticamente ao padrão BHT. Os menores valores de atividade antioxidante foram observados para as variedades Columbus (6,7%), Sorachi (6,76%) e Sladek (5,4%) na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar disso, Columbus e Sorachi exibiram valores bastante expressivos na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ os quais foram menores apenas das variedades citadas anteriormente.

Figura 2 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método ABTS. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

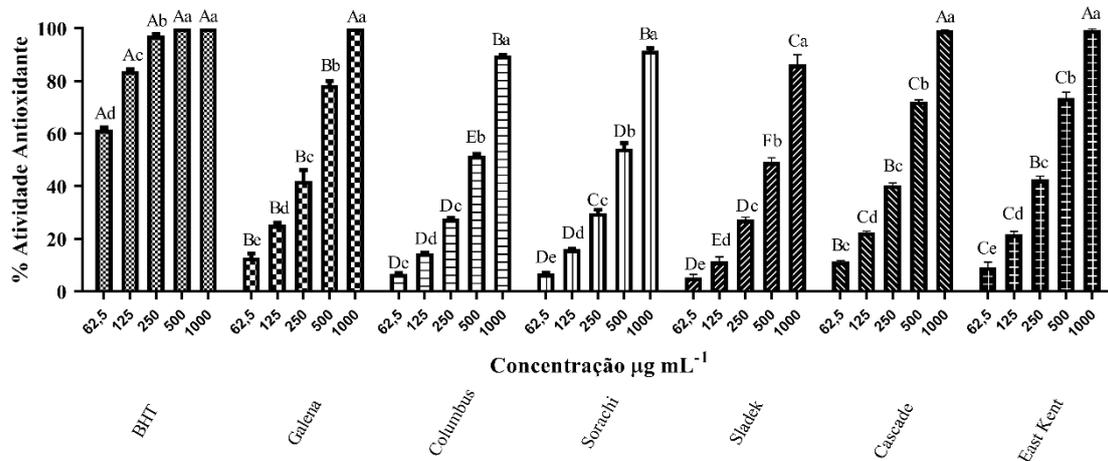


Tabela 2. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método ABTS.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	12,98 Be	25,41 Bd	42,10 Bc	78,47 Bb	100,0 Aa
Columbus	6,70 De	14,52 Dd	27,71 Cc	51,63 Eb	89,72 Ba
Sorachi	6,76 De	16,00 Dd	29,81 Cc	54,36 Db	91,56 Ba
Sladek	5,40 De	11,48 Ed	27,30 Dc	49,24 Fb	86,33 Ca
Cascade	11,37 Be	22,48 Cd	40,34 Bc	72,20 Cb	99,21 Aa
East Kent	9,32 Ce	21,80 Cd	42,55 Bc	73,62 Cb	99,47 Aa
BHT	61,50 Ad	83,78 Ac	97,32 Ab	100,0 Aa	100,0 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Foi possível perceber diferenças estatisticamente significantes entre as variedades em todas as concentrações e em destaque para a variedade Galena, sendo superior em quase todas as concentrações. Em contrapartida a variedade Sladek exibiu valores significativamente inferiores em quase todas as concentrações utilizadas. Apesar das diferenças encontradas na metodologia ABTS terem sido mais significativas do que no DPPH, nenhuma das variedades conseguiu superar o padrão BHT. Analisando as porcentagens de atividade antioxidante de cada amostra referente ao aumento da concentração o que se observou foram diferenças significativas no aumento do potencial antioxidante à medida que a concentração aumenta, cenário esse presente em todas as variedades e no padrão até a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Resultados obtidos por Kowalczyk e colaboradores (KOWALCZYK *et al.*, 2013) indicam menor atividade antioxidante do extrato aquoso em comparação com extratos

metanólicos e etanólicos. Trabalhando com lúpulos peletizados T45 e T90 e com as variedades Magnum de amargor e Marynka considerada mista, os autores conseguiram valores de EC50 significativamente maiores nos extratos aquosos do que naqueles feitos com 50% etanol e 50% metanol. Isso indica que o extrato aquoso de fato tem menor poder antioxidante medido por ABTS. A superioridade do extrato metanólico pode se dar devido a uma melhor extração de compostos fenólicos e não a outros produtos do metabolismo dos lúpulos como alfa ácidos e óleos essenciais que diferem as variedades do nosso trabalho (SZWAJGIER, TARGOŃSKI., 2000).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MEDIDA POR REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Os valores de atividade antioxidante podem ser visualizados na Tabela 3 e o gráfico que os representa está disposto na Figura 3. O menor valor de absorbância foi exibido pela variedade Galena (0,04) na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar disso, não houve diferenças significativas com os demais valores das variedades nessa mesma concentração, apenas o padrão BHT apresentou um valor significativamente superior a todos os extratos. Os maiores valores de absorbância estavam presentes nas variedades East Kent (0,64), Cascade (0,58) e Sorachi (0,60) e todos eles na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. As demais variedades Galenas, Columbus e Sladek revelaram valores de absorbância nessa mesma concentração sem diferença significativa entre elas, entretanto com diferenças significantes em relação às demais variedades e ao BHT.

Figura 3 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método redução do complexo fosfomolibdênio. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

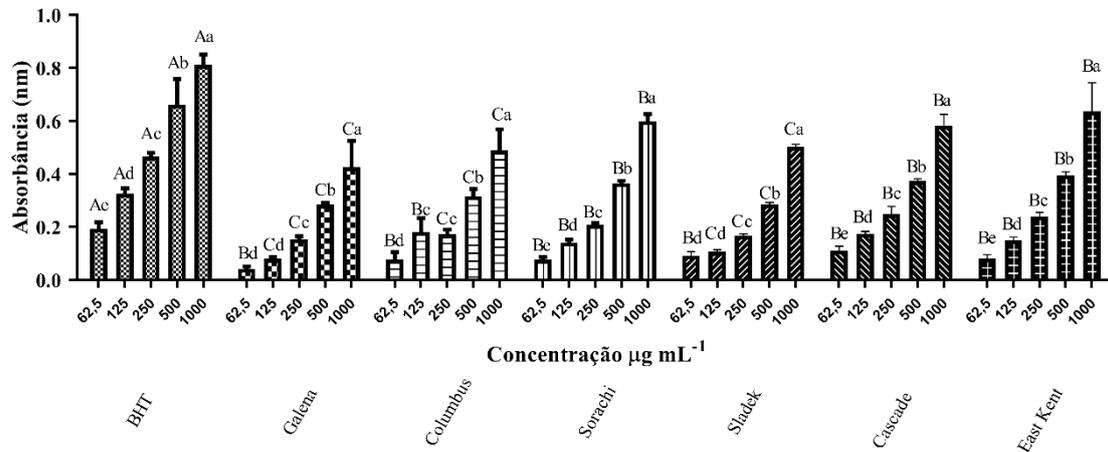


Tabela 3. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método redução do complexo fosfomolibdênio.

Amostras	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	0,04 Bd	0,08 Cd	0,15 Cc	0,28 Cb	0,42 Ca
Columbus	0,08 Bd	0,18 Bc	0,17 Cc	0,32 Cb	0,49 Ca
Sorachi	0,08 Be	0,14 Bd	0,21 Bc	0,36 Bb	0,60 Ba
Sladek	0,09 Bd	0,11 Cd	0,17 Cc	0,28 Cb	0,50 Ca
Cascade	0,11 Be	0,17 Bd	0,25 Bc	0,37 Bb	0,58 Ba
East Kent	0,08 Be	0,15 Bd	0,24 Bc	0,39 Bb	0,64 Ba
BHT	0,19 Ae	0,33 Ad	0,47 Ac	0,66 Ab	0,81 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para as demais concentrações de 125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi possível perceber novamente uma superioridade das variedades Sorachi, Cascade e East Kent em relação às demais. Apenas o extrato da variedade Columbus na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi capaz de exibir um valor de absorvância (0,18) sem diferença estatística com os extratos das variedades previamente citadas. Novamente nenhuma variedade conseguiu superar ou igualar os valores do padrão BHT em nenhuma concentração utilizada no trabalho.

Ao analisar o comportamento da absorvância em relação ao aumento na concentração, dentro de cada variedade e do padrão, foi possível perceber uma tendência de aumento, na maioria das vezes significativa, de maneira semelhante com os métodos anteriores. Esse cenário ocorreu para o padrão e para todas as variedades, com exceção da Columbus na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de absorvância podem ser utilizados para medir a atividade antioxidante, visto que a redução do complexo

fosfomolibdênio é dependente da ação dos antioxidantes para a formação do cromógeno verde, logo quanto maior a atividade antioxidante do extrato maior será a absorvância apresentada por ele (PINEDA, AGUILAR., 1999).

George e colaboradores (2014) testaram a atividade antioxidante de extratos hidroalcolólicos (50% de álcool etílico) de cones de lúpulos por redução do complexo fosfomolibdênio, em concentrações de 1, 0,1, 0,001 e 0,0001 mg mL⁻¹. Seus resultados evidenciaram atividade antioxidante relevante na concentração de 1 mg mL⁻¹ com valor de equivalência do ácido ascórbico de 0,628 mg. Próximo aos resultados do presente trabalho no qual a atividade antioxidante foi maior nas concentrações mais altas e diminuiu consideravelmente nas concentrações mais baixas (GEORGE *et al.*, 2014). Além disso, Vergun e colaboradores (2021) realizaram a mesma metodologia em folhas, flores e caules de lúpulos e evidenciaram maior potencial antioxidante nas flores do vegetal, além de forte correlação do poder redutor do complexo com o teor total de polifenóis encontrados no trabalho (VERGUN *et al.*, 2021).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE AVALIADA PELA METODOLOGIA DO PODER REDUTOR

Os valores de absorvância referentes aos extratos e o padrão obtidos pela metodologia do poder redutor estão dispostos na Tabela 4 e o gráfico que os representa está exibido na Figura 4. O maior valor de absorvância encontrado foi 0,38 na variedade East Kent na concentração de 1000 µg mL⁻¹, seguido pelos valores de 0,34; 0,34; 0,33; 0,30 e 0,25 encontrados nas variedades Cascade, Sorachi, Galena, Columbus e Sladek respectivamente, nessa mesma concentração. Esses resultados revelaram um valor significativamente maior da variedade East Kent em relação às demais. As variedades Cascade, Sorachi e Galena não apresentaram diferenças significantes entre si em nenhuma das concentrações trabalhadas. As demais variedades Columbus e Sladek não foram diferentes estatisticamente entre si em nenhuma das concentrações, entretanto foram inferiores às demais nas concentrações de 1000 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹.

Figura 4 - Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método poder redutor. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

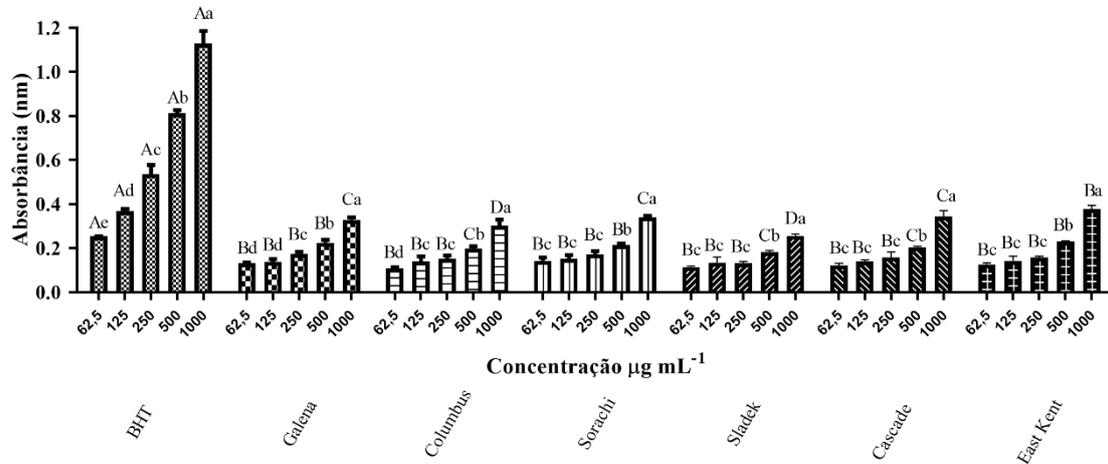


Tabela 4. Atividade antioxidante das seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade e East Kent) e do padrão pelo método poder redutor.

Amostras	Concentração µg mL ⁻¹				
	62,5	125	250	500	1000
Galena	0,13 Bd	0,14 Bd	0,17 Bc	0,22 Cb	0,33 Ca
Columbus	0,11 Bd	0,14 Bc	0,15 Cc	0,20 Cb	0,30 Da
Sorachi	0,14 Bc	0,15 Bc	0,17 Bc	0,21 Bb	0,34 Ca
Sladek	0,11 Bc	0,13 Bc	0,13 Bc	0,18 Cb	0,25 Da
Cascade	0,12 Bc	0,14 Bc	0,16 Bc	0,20 Bb	0,34 Ba
East Kent	0,13 Bc	0,14 Bc	0,16 Bc	0,23 Bb	0,38 Ba
BHT	0,25 Ae	0,37 Ad	0,54 Ac	0,81 Ab	1,13 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

O padrão BHT gerou valores de absorvância significativamente superiores a todos os extratos em todas as concentrações testadas no trabalho, logo o antioxidante sintético exibe maior atividade antioxidante também pela metodologia do poder redutor. Ao comparar as concentrações e a absorvância de cada variedade e do padrão, de maneira individual, revelou-se uma tendência clara de aumento da absorvância em resposta ao aumento na concentração no padrão, onde todas as concentrações maiores foram significativamente superiores às menores.

Entretanto, nas variedades, esse aumento foi menor e nem sempre resultou em superioridade da concentração maior sob a menor, como evidenciado nas variedades Galena (62,5 e 125 µg mL⁻¹), Columbus (62,5 e 125 µg mL⁻¹), Sorachi (62,5, 125 e 250 µg mL⁻¹), Sladek (62,5, 125 e 250 µg mL⁻¹), Cascade (62,5, 125 e 250 µg mL⁻¹) e East Kent (62,5, 125 e 250 µg mL⁻¹). A metodologia do poder redutor tem a capacidade de

avaliar o potencial antioxidante por meio da redução do sistema, ocasionada pelo potencial dos antioxidantes do analito, sendo assim quanto maior a absorbância obtida maior será a atividade antioxidante da amostra ou do padrão (ALAM, BRISTI, RAFIQUZZMAN., 2013).

Niknejad e colaboradores também realizaram a metodologia do poder redutor em seu trabalho com extrato etanólico 50% de flores de lúpulo. Trabalhando com as concentrações de 100 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os autores conseguiram evidenciar comportamento semelhante resultados do presente trabalho com valores de absorbância a 700 nm bastante semelhante, alcançando 0,377 de absorbância na concentração de 700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com pequenos aumentos nas concentrações superiores. O padrão BHT de maneira análoga aos encontrados no presente trabalho foi significativamente superior ao extrato, exibindo aumentos na absorbância em resposta à concentração. Esses resultados evidenciaram a capacidade do extrato de lúpulo em doar elétrons para a redução do complexo Fe^{3+} ferrocianeto para Fe^{2+} , logo os resultados desse trabalho também indicam essa propriedade no extrato aquoso de variedades de amargor e de aroma (NIKNEJAD *et al.*, 2015).

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O total de compostos fenólicos presentes nos extratos de cada uma das variedades pode ser observado na Tabela 5 e o gráfico que os representa está disposto na Figura 5. Os maiores valores de fenólicos totais encontrados foram 117,34; 103,03; e 102,44 mg EAGg^{-1} referentes às variedades East Kent, Cascade e Galena respectivamente e dessas variedades, a East Kent foi significativamente superior às demais com Cascade e Galena em segundo lugar sem diferença significativa entre elas.

As demais variedades exibiram valores de fenólicos totais inferiores com 93,81; 86,26 e 71,95 mg EAGg^{-1} , representando as variedades Sorachi, Columbus e Sladek. Dentre esses menores, todos esses foram diferentes significativamente e entre eles com Sorachi maior que Columbus que foi maior que Sladek. Diante disso duas variedades de aroma e uma de amargor (East Kent, Cascade e Galena) exibiram maior quantidade de fenólicos totais, enquanto duas de amargor e uma de aroma (Sorachi, Columbus e Sladek) apresentaram os menores valores de fenólicos totais.

Figura 5 – Teor de compostos fenólicos totais utilizando seis variedades de lúpulo (Galena, Columbus, Sorachi, Sladek, Cascade, East Kent). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

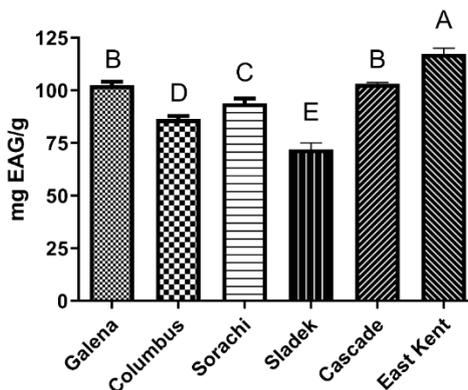


Tabela 5. Valores de compostos fenólicos totais expressos mg de equivalentes de ácido Gálico por grama de peso seco dos lúpulos (mg EAG g⁻¹).

Amostras	mg EAG/g
Galena	102,44 B
Columbus	86,26 D
Sorachi	93,81 C
Sladek	71,95 E
Cascade	103,03 B
East Kent	117,34 A

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Almeida e colaboradores (2019), trabalhando com extratos etanólicos, evidenciaram resultados que indicam a forte participação desses compostos fenólicos do lúpulo na capacidade antioxidante do extrato. Diversos compostos fenólicos encontrados nos extratos da variedade Cascade podem ter contribuído, com destaque para isoquercetina e a quercetina, que foram presentes em maior concentração que os demais (ALMEIDA *et al.*, 2019). No presente trabalho a variedade Cascade exibiu o segundo maior valor encontrado para o teste do teor dos compostos fenólicos, entretanto outros compostos encontrados no trabalho citado podem estar expressos em diferentes concentrações nos pellets, superando inclusive a quercetina e a isoquercetina.

Já para a metodologia da redução do complexo de fosmolibdênio os compostos fenólicos parecem não ser os principais agentes determinantes, quando George e colaboradores (2014), evidenciaram que o extrato etanólico de lúpulo com quantidades menores de fenólicos exibiu maior atividade antioxidante por essa abordagem, quando comparado ao extrato etílico de mirtilo, muito mais rico em compostos fenólicos (GEORGE *et al.*, 2014).

Aaron e colaboradores (2012), trabalharam com extrato aquoso de lúpulos da variedade Galena e eluíram por cromatografia polifenóis de interesse. Foram identificados a presença de quercetina, kaempferol e catequina os primeiros encontrados em conjugados a glicosídeos e o último em formas de dímeros e trímeros. É possível que esses compostos também estejam presentes nos nossos extratos, contribuindo para o valor de compostos fenólicos encontrados nessa variedade (AARON *et al.*, 2012).

Mikyška e Jurková (2019), encontraram compostos fenólicos livres em extratos aquosos de lúpulos da variedade Sladek. Nessa variedade os fenólicos livres foram representados pelas hidroxycoumarinas seguidos de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavan-3-ols, flavonas, flavononas e flavonóis, todos esses podem estar presentes no extrato do presente trabalho da variedade Sladek e podem ter contribuído para fazer dessa variedade a detentora do menor valor de fenólicos por Folin Ciocalteu (MIKYŠKA, JURKOVÁ., 2019).

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS VARIEDADES DE LÚPULO EXPRESSA EM EQUIVALENTES DO PADRÃO

Os valores de equivalentes de massa/massa obtidos no presente trabalho estão dispostos na Tabela 6. Esses valores expressam a equivalência da atividade antioxidante produzida pela massa em miligramas do padrão BHT que corresponde a massa de 1 g do material vegetal, oriundo da variedade testada. No ensaio DPPH as variedades East Kent (626,7 mg EBHT g⁻¹), Galena (593,3 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (588 mg EBHT g⁻¹) exibiram os maiores valores respectivamente sem nenhuma diferença significativa entre elas. Os menores valores foram expressos pelas variedades Sorachi (213,3 mg EBHT g⁻¹), Columbus (284,0 mg EBHT g⁻¹) e Sladek (290,7 mg EBHT g⁻¹) também sem diferenças significativas entre si. Entretanto todas as três variedades foram inferiores às demais.

Tabela 6. Valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT (mg equivalente ao BHT por g do extrato) das 6 variedades de lúpulo analisadas

Amostras	DPPH mg EBHT g ⁻¹	ABTS mg EBHT g ⁻¹	Complexo fosfomolib. mg EBHT g ⁻¹	Poder Redutor mg EBHT g ⁻¹
Galena	593,3 A	165,3 A	231,7 D	90,1 A
Columbus	284,0 B	94,0 B	276,8 C	53,4 B
Sorachi	213,3 B	104,0 B	352,0 B	75,3 A
Sladek	290,7 B	92,3 B	232,0 C	30,5 C
Cascade	588,0 A	155,7 A	363,7 B	62,0 B
East Kent	626,7 A	167,7 A	398,7 A	97,2 A

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para a metodologia ABTS os maiores valores também foram expressos pelas variedades East Kent (167,7 mg EBHT g⁻¹), Galena (165,3 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (155,7 mg EBHT g⁻¹), os quais não foram significativamente diferentes entre si. Os menores valores continuaram sendo apresentados pelas variedades Sladek (92,3 mg EBHT g⁻¹), Columbus (94,0 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (104,0 mg EBHT g⁻¹) sem diferenças significantes entre si, mas significativamente inferiores às demais variedades. Valores estes coerentes com o gráfico de atividade antioxidante medida por ABTS que evidenciou a superioridade de Sladek, Galena e Cascade sob as demais.

Na metodologia da redução do complexo fosfomolibdênio os maiores valores encontrados foram exibidos pelas variedades East Kent (398,7 mg EBHT g⁻¹), Cascade (363,7 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (352,0 mg EBHT g⁻¹), com a primeira sendo significativamente superior às outras duas que não foram diferentes entre si. Os menores valores foram exibidos pelas variedades Galena (231,7 mg EBHT g⁻¹), Sladek (232,0 mg EBHT g⁻¹) e Columbus (276,8 mg EBHT g⁻¹) e dentre elas a variedade Galena foi significativamente inferior às demais que não foram diferentes entre si. A alternância da posição da capacidade antioxidante dos extratos nas diferentes metodologias indica que a complexidade dos extratos que podem conter certos componentes que participam ou não do mecanismo de reação da metodologia de avaliação da atividade antioxidante.

Os resultados obtidos pela metodologia do poder redutor expressos em equivalência indicaram superioridade do potencial antioxidante das variedades East Kent (97,2 mg EBHT g⁻¹), Galena (90,1 mg EBHT g⁻¹) e Sorachi (75,3 mg EBHT g⁻¹) sob as demais variedades e essas três não apresentaram diferenças significantes entre si. Já as variedades Sladek (30,5 mg EBHT g⁻¹), Columbus (53,4 mg EBHT g⁻¹) e Cascade (62,0 mg EBHT g⁻¹) foram inferiores estatisticamente das outras 3 com Sladek em último lugar e Cascade e Columbus empatadas em segundo sem diferenças significantes entre si.

Todos esses resultados colocam o potencial antioxidante ranqueado da seguinte maneira East Kent > Galena > Cascade > Sorachi > Columbus > Sladek, o que não é suficiente para colocar as variedades de aroma como superiores às de amargor, reforçando a ideia de o potencial antioxidante ser individual de cada variedade e não responsivo ao tipo dela.

4 CONCLUSÃO

É notório que os fitoquímicos presentes no lúpulo podem contribuir consideravelmente para a atividade antioxidante da cerveja. Dentre as variedades e tipos

de lúpulos utilizados pela indústria cervejeira existe um potencial antioxidante variável a ser explorado. Os resultados indicam que o potencial antioxidante do lúpulo não depende se a variedade é de amargor ou aroma, análises mais refinadas são necessárias para confirmar a hipótese.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 143-152, abr. 2013.
- ALMAGUER, C. et al. Comparative Study of the Contribution of Hop (*Humulus Lupulus* L.) Hard Resins Extracted from Different Hop Varieties to Beer Quality Parameters. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 115-123, abr. 2015.
- ALMEIDA, A. R. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 340-347, 16 ago. 2019. Wiley.
- ANTUNES, M.D.C. et al. Effects of posthar-vest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, p. 6173–6181, 2010.
- ARON, P. M.; TING, P. L.; SHELLHAMMER, T. H. HPLC-ESI-MS Identification of Hop-Derived Polyphenols That Contribute Antioxidant Capacity and Flavor Potential to Beer. **Acs Symposium Series**, [S.L.], p. 217-234, jan. 2012. American Chemical Society.
- D, L. L. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.
- DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; BOGUSZ, Stanislaw. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.
- GEORGE, B.; CORINA, B.; GHEORGHE, C. Antioxidant activity of *Humulus lupulus* and *Vaccinium myrtillus* individual and combined extracts. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucureste, v. 20, n. 2, p. 10277-10285, 2015.
- HOPLIST. **Hop Varieties**. Disponível em <<https://www.hoplist.com/hops/>> Acesso em: 8 set. 2020.
- JASKULA-GOIRIS, B. et al. The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, maio 2014.
- KARABÍN, M. et al. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 542-567, 1 mar. 2016.
- KOWALCZYK, D. et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], p. 103-110, jul. 2013. Wiley.
- KROFTA, K.; MIKYŁKA, A.; HAŁKOVÁ, D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008. Wiley.

LIU, M. et al. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 754-779, 7 jan. 2015.

NIKNEJAD, F. et al. Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Flower Extracts. **Advances In Environmental Biology**, [s. l], v. 24, n. 8, p. 395-401, 2015.

OYAIZU, M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. **Jpn. J. Nutr**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin e. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, maio 1999. Elsevier BV

SINGLETON, V. L. ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16, 144-158, 1965.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops a review. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 96-107, 4 mar. 1981.

SZWAJGIER, D.; TARGOŃSKI, Z. Comparison of in vitro antioxidant activities of malt, hops, worts and lager type beer. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences: formerly Acta Alimentaria Polonica**, [s. l], v. 50, n. 4, p. 53-59, 2000