

UNIVERSIDADE CESUMAR
PROGRAMA DE MESTRADO EM TECNOLOGIAS LIMPAS-PPGTL

RODRIGO SADA O INUMARO

EXTRAÇÃO VERDE POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE
RESÍDUO DE *Humulus lupulus* L.: CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E BIOATIVIDADES

MARINGÁ
2023

RODRIGO SADA O INUMARO

EXTRAÇÃO VERDE POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE
RESÍDUO DE *Humulus lupulus* L.: CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E BIOATIVIDADES

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Tecnologias Limpas da
Universidade Cesumar, como requisito para
obtenção do título de MESTRE EM
TECNOLOGIAS LIMPAS.*

*Orientador: Prof^a. Dr^a. José Eduardo
Gonçalves.*

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Arian a Ferrari.

MARINGÁ
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I61e Inumaro, Rodrigo Sadao.

Extração verde por fluído supercrítico de resíduo de *Humulus lupulus* L.: caracterização química e bioatividades / Rodrigo Sadao Inumaro. – Maringá-PR: UNICESUMAR, 2023.

98 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves.

Coorientadora: Profa. Dra. Arianne Ferrari.

Dissertação (mestrado) – Universidade Cesumar - UNICESUMAR, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas, Maringá, 2023.

1. biorresíduo cervejeiro. 2. compostos bioativos. 3. reaproveitamento. 4. valorização de subprodutos. I. Título.

CDD – 628.4

Leila Nascimento – Bibliotecária – CRB

9/1722Biblioteca Central UniCesumar

Ficha catalográfica elaborada de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

RODRIGO SADA O INUMARO

**EXTRAÇÃO VERDE POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO DE
RESÍDUO DE *Humulus lupulus* L.: CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E BIOATIVIDADES**

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas da
Universidade Cesumar, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM
TECNOLOGIAS LIMPAS pela comissão julgadora composta pelos membros:*

COMISSÃO JULGADORA

Prof Dr José Eduardo Gonçalves (Presidente)
Universidade Cesumar – UNICESUMAR

Profª Drª Rúbia Carvalho Gomes Corrêa
Universidade Cesumar - UNICESUMAR

Profª. Drª Juliana Cristina Castro
Universidade Estadual de Maringá -UEM

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2023.

Dedico esse trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e aos meus antepassados, que me dão forças, proteção e orientação diariamente;

Aos meus pais que são a minha base e fortaleza, por todo o amor, dedicação, também por sempre acreditarem no meu potencial e dando oportunidades para o meu crescimento;

Ao meu irmão Vinicius, meu companheiro, que sempre está junto comigo e que tenho muito orgulho;

À minha família que é meu exemplo de força, luta e meu porto seguro;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves, por estar comigo desde o início dessa jornada da minha formação que começou na iniciação científica, por ter me proporcionado tantas oportunidades para o meu crescimento e desenvolvimento. Também por toda a paciência, dedicação e companheirismo nesse ciclo;

Aos membros da banca Prof^a Dr^a Rúbia Carvalho Gomes Corrêa e Prof^a. Dr^a Juliana Cristina Castro, agradeço desde já pela disponibilidade, sugestões e contribuições à este trabalho;

Aos meus amigos do mestrado e laboratório: Rhaira Casalvara, Eduarda Bernardino, Karoline Souza, Edilaine Corrêa, Cintia Belmont, Geovana Oliveira, Vitória Silva e Douglas Lima;

À Laura Mardigan, Thaila Oliveira e Dayane Santos, por toda a dedicação, paciência, esforços e amizade que tivemos durante a construção desse trabalho;

À minha prima/irmã Hikari por sempre me incentivar, e que é exemplo para mim de dedicação, força, resiliência, alegria e luz;

Aos Laboratórios: Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Química (LIABQ), Laboratório de Análises Agronômicas (AGROLAB), Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Equilíbrio de Fases (LTSEF) e ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO) pela parceria;

Ao ICETI-UniCesumar pelo apoio financeiro da minha bolsa;

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a construção desse trabalho.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido”

Marie Curie

RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) pertence à família *Cannabaceae*. Sua produção ocorre principalmente em climas temperados do hemisfério norte do globo terrestre. Seu valor comercial está atrelado à inflorescência da planta feminina denominada por cone, essa por sua vez é amplamente empregada na indústria cervejeira, por conta da sua rica composição química, e esta agrega propriedades sensoriais à bebida. Os metabólitos secundários como o óleo essencial, resina e polifenóis são responsáveis por incorporar as notas aromáticas na cerveja. Entretanto, esses compostos apresentam também propriedades biologicamente ativas como potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e outros. As folhas e caules do lúpulo formam uma grande biomassa residual da produção agrícola e a cadeia produtiva cervejeira também é responsável por gerar um grande volume de resíduos sólidos, que implicam em um expressivo impacto financeiro e ambiental. Porém, diversos estudos têm verificado as possibilidades de aplicações biotecnológicas desses subprodutos cervejeiros. Desse modo, esse estudo teve por objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a planta, seus biorresíduos e as suas potenciais aplicações biotecnológicas. Além disso, foi realizado a extração assistida por fluído supercrítico (FSC) do biorresíduo cervejeiro, no qual analisou a otimização da extração com a variação dos parâmetros extrativos: temperatura (°C), pressão (bar) e porcentagem de cossolvente (etanol). Foram analisados a composição química por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Pioneiramente, pode-se verificar que a extração do cone do lúpulo residual por FSC é eficiente e teve rendimentos superiores a 11% com exceção do extrato 1. Os extratos apresentaram importantes compostos das classes de terpenos e ácidos amargos. Ainda, ensaios da atividade antioxidante demonstraram que o extrato 5 (40 °C, 100 bar, 10% etanol) revelou satisfatórios resultados para DPPH: 1048.22 ± 7.89 ; FRAP: 746.00 ± 4.64 e ABTS: 1095.67 ± 13.30 $\mu\text{mol Trolox mg/PS}$, já o extrato 1 (40 °C, 100 bar, 5% etanol) exibiu importantes valores no ensaio OxHLIA (37 ± 2 $\mu\text{g/mL}$), ainda no ensaio TBARS, o extrato 8 (60 °C, 200 bar, 10% etanol) revelou interessante resultado (0.3 ± 0.06 mg/ml). Ademais, os extratos demonstraram atividade antimicrobiana para as bactérias: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* com valores de CIM variando entre 5,0 - 10 mg/ml. Além disso, o extrato se mostrou seguro para uso em formulações do setor farmacêutico e nutricional, visto que não demonstrou hepatotoxicidade em ensaios citotóxicos com as células PLP2. Diante

disso, o biorresíduo cervejeiro, ainda subexplorado, se mostra como uma fonte de compostos com potencial bioatividades, podendo ser reutilizado em setores farmacêuticos e alimentar para o desenvolvimento de produtos a partir dessa matéria-prima sustentável.

Palavras-chave: biorresíduo cervejeiro; compostos bioativos; reaproveitamento; valorização de subprodutos.

ABSTRACT

Hops (*Humulus lupulus* L.) belongs to the family Cannabaceae. The production occurs mainly in temperate climates in the northern hemisphere of the globe. The commercial value is linked to the inflorescence of the female plant called cone, which in turn is widely used in the brewing industry, due to the rich chemical composition, and this adds sensory properties to the beverage. Secondary metabolites such as essential oil, resin, and polyphenols are responsible for incorporating aromatic notes in beer. However, these compounds also have biologically active properties such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and other potentials. The leaves and stems of hops form a large residual biomass of agricultural production and the brewing production chain is also responsible for generating a large volume of solid residues, which imply a significant financial and environmental impact. However, several studies have verified the possibilities of biotechnological applications of these beer by-products. Thus, this study aimed to conduct a bibliographic survey about the plant, its bio-waste, and its potential biotechnological applications. In addition, the extraction assisted by supercritical fluid (FSC) of the beer bioresidue was performed, in which the optimization of the extraction was analyzed with the variation of the extractive parameters: temperature (°C), pressure (bar) and percentage of cosolvent (ethanol). The chemical composition was analyzed by means of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Firstly, it could be verified that the extraction of the residual hop cone by FSC is efficient and had yields higher than 11% with the exception of extract 1. The extracts presented important compounds of the terpene and bitter acid classes. Also, antioxidant activity assays demonstrated that extract 5 (40 °C, 100 bar, 10% ethanol) showed satisfactory results for DPPH: 1048.22 ± 7.89 ; FRAP: 746.00 ± 4.64 and ABTS: 1095.67 ± 13.30 $\mu\text{mol Trolox mg/DW}$, already the extract 1 (40 °C, 100 bar, 5% ethanol) showed important values in the OxHLIA assay (37 ± 2 $\mu\text{g/mL}$), still in the TBARS assay, the extract 8 (60 °C, 200 bar, 10% ethanol) revealed interesting result (0.3 ± 0.06 mg/ml). Furthermore, the extracts showed antimicrobial activity for bacteria: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* with MIC values ranging from 5.0 - 10 mg/ml. In addition, the extract was shown to be safe for use in pharmaceutical and nutritional formulations, as it did not show hepatotoxicity in cytotoxic assays with PLP2 cells. Therefore, the beer bio-waste, still underexplored, shows it self as a

source of compounds with potential bioactivities, and can be reused in pharmaceutical and food sectors for the development of products from this sustainable raw material.

Keywords: beer bioresidue; bioactive compounds; reuse; valorization of by-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cone do lúpulo em corte longitudinal com destaque para gândula lupulina...	22
Figura 2. Esquema de produção industrial de cerveja e geração de biorresíduos.	41
Figure 3. Schematic diagram of the extraction equipment.....	91
Figure 4. PCA of the compounds, yield, and antioxidant activity.....	92
Figure 5. HCA of the compounds, yield, and antioxidant activity.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais substâncias presentes em flores secas de lúpulo.	22
Tabela 2. Atividades biológicas reportadas com o lúpulo. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 3. Composição química dos resíduos sólidos gerados pela indústria cervejeira.....	43
Tabela4. Principais trabalhos de aplicações biotecnológicas desenvolvidos com os biorresíduos.	45
Tabela 5. Composição de macro e micronutrientes presentes em diferentes matérias-primas de compostagem.	48
Table 6. Extraction conditions and extract yield.....	86
Table 7. Compounds of the terpene and bitter acid class identified by GC-MS.....	87
Table 8. <i>In vitro</i> antioxidant potential of the hop cone residue extracts.....	89
Table 9. Antibacterial potential of the hop cone residue extracts.....	90
Table 10. Hepatotoxicity (GI ₅₀ , µg/mL) in non-tumor cells (PLP2).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico)
B.A.	<i>Bitter acid</i>
C/N	Relação carbono nitrogênio
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetro/ <i>Centimeter</i>
cm³	Centímetro cúbico
CO₂	<i>Carbon dioxide</i>
COt	Carbono total
COt	Carbono orgânico total
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC₅₀	Concentração necessária para causar 50% do potencial bioativo
EtOH	Etanol/ <i>Ethanol</i>
FeSO₄	<i>Ferrous sulphate</i>
FRAP	Capacidade de redução do ferro
FSC	Extração assistida por fluído supercrítico
g	<i>Grams</i>
g/kg	Gramas por kilograma
GCG	Grão de cevada gasta
GC-MS	<i>Chromatography coupled with mass spectrometry</i>
GI50	<i>Concentration that provides 50% inhibition of cell growth</i>
h	<i>Hour</i>
HJ	<i>Humulus japonicus</i> L.
HL	<i>Humulus lupulus</i> L.

Ht50	<i>Half the hemolysis time</i>
HY	<i>Humulus yunnanensis L.</i>
IC₅₀	<i>Concentration needed to inhibit a biological process by 50%</i>
kg	<i>Quilograma/ Kilogram</i>
kg/hl	<i>Quilograma por hectolitro</i>
kHz	<i>Kilohertz</i>
L	<i>Litro</i>
LCG	<i>Levedura de cerveja gasta</i>
m	<i>Meter</i>
m/z	<i>Charge mass ratio</i>
m³	<i>Metro cúbico/ Cubic meter</i>
Marc-145	<i>Linhagem de células epiteliais de rim embrionário verde africano</i>
MBC	<i>Minimum bactericidal concentrations</i>
mg	<i>Miligrama/ Milligram</i>
mg ER/g	<i>Miligrama equivalente de rutina por grama</i>
mg/mL	<i>Miligrama por mililitro/ Milligram per milliliter</i>
MHz	<i>Mega hertz</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentrations</i>
min	<i>Minute</i>
MJ kg⁻¹	<i>Megajoules por quilograma</i>
mL	<i>Milliliter</i>
mL/min	<i>Milliliter per minute</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mM	<i>Millimolar</i>
mol/L	<i>Mol per liter</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina</i>
nm	<i>Nanometer</i>
Nrf2-HMOX1	<i>Fator nuclear-eritróide 2 relacionado ao fator 2</i>
Nt	<i>Nitrogênio total</i>

O.S.	<i>Oxygenated sesquiterpene</i>
OxHLIA	<i>Oxidative Hemolysis Inhibition Assay</i>
PAMs	<i>Porcine Alveolar Macrophage</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline solution</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLP₂	<i>Primary pig liver cells</i>
Pt	Proteína total
RI	<i>Retention indexes</i>
S.F.	<i>Supercritical fluid</i>
S.H.	<i>Sesquiterpene hydrocarbon</i>
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substance</i>
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta 1
TQ	Trub quente
w/v	<i>Weight per volume</i>
μg/mL	Microgramas por mililitro/ <i>Microgram per milliliter</i>
μL	<i>Microliter</i>
μM	Micro mol
μM/g	Micro mol por grama
μmol Trolox/mg	<i>Micro mol of Trolox per milligram</i>
μmol/L	<i>Micro mol per liter</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Botânica da espécie	21
3.2 Composição química	22
3.3 Setor cervejeiro: importância econômica e geração de resíduos	24
3.4 Aplicação da química verde e tecnologias limpas nos métodos de extração	25
REFERÊNCIAS	27
4. ARTIGO 1	30
4.1 Introdução	30
4.2 Aspectos botânicos do lúpulo	32
4.2.1 Botânica da espécie	32
4.2.2 Planta feminina	33
4.2.3 Planta masculina	33
4.2.4 Partes aéreas da planta (folhas e hastes)	34
4.3 Fitoquímica e bioatividades	34
4.3.1 Metabólitos primários	34
4.3.2 Metabólitos secundários	34
4.3.2.1 Resinas	34
4.3.2.2 Óleo essencial	35
4.3.3.3 Polifenóis	36
4.4 Potencial biotecnológico do lúpulo e de seus biorresíduos	39
4.4.1 Geração dos biorresíduos	39
4.4.2. Aplicação biotecnológica dos biorresíduos do lúpulo	43
4.4.2.1 Abordagens tecnológicas do resíduo cervejeiro	48
4.5 Considerações finais e perspectivas futuras	50
5. ARTIGO 2	69
5.1 Introduction	69
5.2 Material and methods	71
5.2.1 Sample	71
5.2.2 Extraction assisted by Supercritical Fluid	71
5.2.3 Chromatographic characterization	72
5.2.4 Antioxidant activity	72
5.2.4.1 Oxidative Hemolysis Inhibition Assay (OxHLIA)	72

5.2.4.2 TBARS test	73
5.2.4.3 DPPH radical scavenging activity assay	73
5.2.4.4 ABTS radical scavenging activity assay	73
5.2.4.5 Reduction of iron (III) to iron (II) (FRAP).....	74
5.2.5 Cytotoxic activity	74
5.2.6 Antimicrobial activity.....	75
5.2.7 Statistical analysis	75
5.3 Results and discussion.....	75
5.3.1 Extraction conditions and yield	75
5.3.2 Chromatographic Analysis	76
5.3.3 Antioxidant activity.....	77
5.3.4 Antimicrobial activity.....	78
5.3.5 Cytotoxic activity	79
5.3.6 PCA map.....	79
5.4 Conclusion.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98

1. INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus* L. que é popularmente conhecido como lúpulo pertence à família *Cannabaceae*, possui a característica de ser dioica, trepadeira, perene e sua presença localizada em climas temperados das regiões europeias, asiáticas e da América do Norte. Seu valor econômico está associado à indústria cervejeira por ser um dos ingredientes de maior importância para a produção da bebida, e também por apresentar vários compostos bioativos. Há muito tempo o lúpulo vem sendo utilizado na medicina popular para o tratamento de patologias como ansiedade, distúrbios do sono e insônia (ALONSO-ESTEBAN *et al.*, 2019; CARBONE *et al.*, 2020).

Nas plantas femininas de *H. lupulus*, os compostos bioquímicos são sintetizados em maiores concentrações nas glândulas lupulinas dos cones; entanto, fatores como a variedade da espécie, condições climatológicas e estágio de maturação podem influenciar na disponibilidade das substâncias (ASTRAY *et al.*, 2020a).

As substâncias bioativas do lúpulo apresentam atividades biológicas como: função estrogênica, ação antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimetastásica, antiproliferativa e antiangiogênica. Essas propriedades estão associadas com os metabólitos secundários do cone, sendo a resina fonte de vários dele. A mesma é dividida em resina dura e resina macia, onde a fração macia apresenta uma concentração de 10 a 25% do peso total do cone seco e é constituída pelos ácidos amargos (α e β -ácido) (ASTRAY *et al.*, 2020).

O óleo essencial da *H. lupulus*, composto majoritariamente por terpenóides, tem grande valor para a cervejaria por acrescentar notas aromáticas (DURELLO *et al.*, 2019). Além disso, há os polifenóis que são classificados em: flavonoides, flavan-3ols, ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos, possuindo atividade antioxidante (KARABÍN *et al.*, 2016a).

A indústria cervejeira brasileira, tem crescido cerca de 23% ao ano, com destaque para o aumento das cervejarias artesanais. Esse setor produz bebidas únicas devido aos diversos tipos de lúpulo com diferentes compostos, concentrações de óleos essenciais e resinas que podem ser encontrados no mercado (GOMES *et al.*, 2021). A cerveja é mundialmente consumida, sendo a quinta bebida mais ingerida pela população global. No ano de 2018, o consumo mundial de cerveja foi de aproximadamente 1.88 bilhões de hectolitros e sua produção ultrapassou os 1.94 bilhões de hectolitros. Devido ao grande volume de produção, o processo cervejeiro gera quantidades significativas de resíduos sólidos durante as etapas de fabricação (RACHWAŁ *et al.*, 2020a).

As empresas do setor cervejeiro produzem em média 1,22 kg/hL de sedimentos de filtração, correspondendo a 7% da massa dos grãos utilizados, sendo este filtrado a maior fonte de resíduos do processo. Para se produzir 1 m³ de cerveja são gerados aproximadamente 51,2 kg de resíduos sólidos (KOPEĆ *et al.*, 2020; KOPEĆ *et al.*, 2021). Dentre os diferentes resíduos da produção cervejeira, o trub quente é caracterizado como um sedimento formado durante a fervura do mosto (que contém o lúpulo). Este biorresíduo é formado por proteínas, polifenóis, carboidratos, substâncias amargas, gorduras, e ácidos amargos (STERCZYŃSKA *et al.*, 2021).

A constituição do *hot trub* pode variar por conta de diversos fatores como: tipo de cevada e lúpulo; concentração e grau de solubilização das substâncias do lúpulo; tempo de homogeneização, entre outros (SENNA FERREIRA COSTA *et al.*, 2021). No entanto, 85% dos compostos que estão presentes no lúpulo não se solubilizam e são descartados como subproduto (KERBY; VRIESEKOOOP, 2017). Assim, diversas tecnologias são utilizadas para o reuso dos subprodutos agroindustriais para minimizar os impactos ambientais e reduzir o volume desse descarte, a fim de reaproveitar o valores e as propriedades funcionais dos biorresíduos (SARAIVA *et al.*, 2019).

Os processos extrativos de produtos naturais são utilizados pelo homem há muitos anos com a finalidade medicinal, alimentar e de perfumaria (CHEMAT *et al.*, 2012). Todavia, as técnicas convencionais de extração possuem algumas desvantagens como: longos períodos de extração, alto consumo de solventes e energia, potencial de degradação de compostos termolábeis (ou perda de funcionalidade dos mesmos), custo elevado, além de grande geração de resíduos (LI *et al.*, 2013).

Contrariamente ao exposto acima, em 1998, Paul Anastas e John Warner apresentaram para a comunidade científica o termo Química Verde e seus doze princípios. O objetivo desta abordagem é de economizar os elementos químicos, utilizar métodos catalíticos e controlar os danos provocados no meio ambiente pelas atividades químicas (ARMENTA *et al.*, 2019).

A Química Verde apresenta como conceito principal a minimização no uso ou geração de substâncias malignas durante o processo a fim de mitigar os riscos à saúde humana e o meio ambiente (DE MARCO *et al.*, 2019). A partir disso, diversas metodologias de extração foram desenvolvidas. Um exemplo é a extração por fluído supercrítico, baseada na propriedade supercrítica do fluído; nesta condição o fluido possui tanto a propriedade de um gás quanto a de um líquido, sendo eficiente na extração de substâncias bioativas (PANJA, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo objetivou em realizar o levantamento da literatura atualizado sobre a planta *Humulus lupulus* L. e os biorresíduos gerados por seu cultivo agrícola e do setor cervejeiro. Assim como realizar a extração assistida por fluído supercrítico do resíduo cervejeiro, avaliar a sua composição química e bioatividades.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Realizar um levantamento literário atualizado sobre o lúpulo, fitoquímica, biorresíduos e o seu potencial biotecnológico;
- b. Otimizar a extração assistida por fluído supercrítico do resíduo cervejeiro verificando o rendimento de extração e os compostos recuperados;
- c. Analisar a composição química dos extratos brutos do resíduo cervejeiro por meio da cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM);
- d. Verificar e comparar a atividade antioxidante por ensaios *in vitro* e seu potencial antimicrobiano dos extratos;
- e. Avaliar a hepatotoxicidade por teste *in vitro*;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Botânica da espécie

O gênero *Humulus* pertence à família Cannabaceae e possui três espécies principais: *Humulus japonicus*, *Humulus yunnanensis* e *Humulus lupulus* L.. A última, popularmente conhecida por lúpulo, é de maior interesse e valor comercial por ser um ingrediente chave na produção das cervejas e utilizado há muito tempo como uma planta medicinal no tratamento de doenças e sintomatologias como: ansiedade, insônia, tensão nervosa, irritação, depressão e distúrbios digestivos (CARBONE *et al.*, 2020; NUUTINEN, 2018).

O lúpulo possui a característica de ser uma planta perene, dioica, trepadeira e adaptada aos climas temperados das regiões da Europa, Ásia e América do Norte (ALONSO-ESTEBAN *et al.*, 2019). Essas espécies são classificadas em cinco variedades baseados nas suas características morfológicas e localização geográfica: *H. lupulu*, presente na Europa e sudoeste Asiático; *H. cordifolius*, comum na Ásia Oriental; e finalmente *H. lupuloides*, *H. neomexicanus* e *H. pubescens*, encontradas na América do Norte (BOCQUET *et al.*, 2018).

Segundo LIN *et al.* (2019a), as plantas femininas produzem inflorescências em forma de cone, com o tamanho que podem variar de 2,5 a 5,0 cm de comprimento, formado por brácteas membranosas sobrepostas. No entanto, as espécies masculinas produzem panículas multibranadas compondo diversas flores pequenas, com comprimento variando entre 7,5 a 12,5 cm. As flores masculinas produzem pólen que pode ser disperso pelo vento e acabar polinizando os cones femininos que geram sementes. No mundo, muitos produtores acabam retirando as espécies masculinas do *H. lupulus* para evitar o processo de polinização, já que as sementes são malquistas pela indústria cervejeira por possuírem menores teores de óleos essenciais e resinas. Além disso, a oxidação dos ácidos graxos das sementes gera sabores indesejados na cerveja.

O cone e as outras partes da planta (folhas, caules e rizomas) são ricas em diferentes moléculas bioativas como os compostos polifenólicos, responsáveis por diversos efeitos benéficos a saúde. As glândulas de lupulinas (Figura 1) possuem uma cor amarelada e localizam-se na umbela do lúpulo (nos bracteoles internos e externos). Contendo as resinas amargas e substâncias aromáticas. Ainda, os metabólitos secundários das glândulas lupulinas podem ser divididos em três grupos: ácidos amargos e seus derivados, os componentes do óleo essencial, e os polifenóis. As concentrações do óleo essencial aromático e dos ácidos α e β do lúpulo dependem de vários fatores, como a variedade ou estágio de maturação e das condições edafoclimáticas (ASTRAY *et al.*, 2020a).

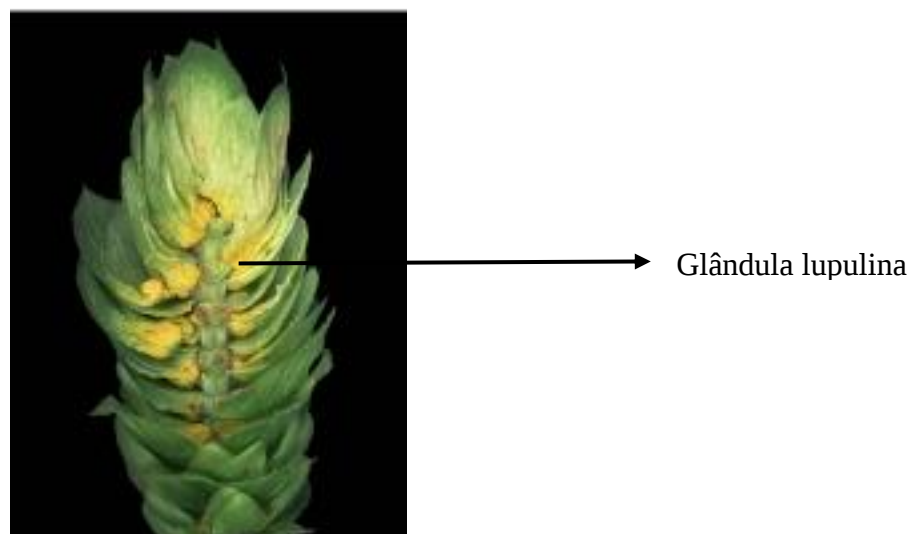


Figura 1. Cone do lúpulo em corte longitudinal com destaque para glândula lupulina. Fonte: Adaptado de Nagel *et al.*, (2008).

3.2 Composição química

Os estudos mostram que o lúpulo e as suas substâncias bioativas possuem várias propriedades como: atividade estrogênica, ação antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimetastática, antiproliferativa e antiangiogênica. Essas ações estão relacionadas com os diversos componentes metabólitos secundários do cone que podem ser agrupados em diferentes frações: resinas totais, óleos essenciais, polifenóis, ceras, entre outros. Na Tabela 1 mostra os componentes principais do lúpulo com as concentrações médias apresentadas em 10% de umidade (HRNČIČ *et al.*, 2019a).

Tabela 1. Principais substâncias presentes em flores secas de lúpulo.

Componente	Concentração % (m/m)
Resinas totais	15 - 30
Óleos essenciais	0,5 - 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	Traços - 25

Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

Fonte: DURELLO; SILVA; BOGUZS, 2019

As resinas são um dos metabólitos secundários do lúpulo e a sua porção total pode ser dividida em: (1) resina macia e (2) resina dura, as quais são caracterizadas pela capacidade de ser solúvel e insolúvel no hexano, respectivamente. A fração dura da resina é composta majoritariamente pelo xanthohumol, um flavonoide prenilado que confere o amargor à cerveja (TANIGUCHI *et al.*, 2015).

Já a resina macia é formada pelos α e β -ácidos, sendo o segmento do α -ácido composto pela humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona. Por outro lado, a parte do β -ácido apresenta os compostos homólogos e a lupulona. Essas resinas podem sofrer o processo de oxidação durante o armazenamento e também os α -ácidos no decorrer da fermentação sofrem a isomerização para iso- α -ácidos, responsáveis pelo sabor amargo das cervejas (ASTRAY *et al.*, 2020a).

Os óleos essenciais do lúpulo são sintetizados nas glândulas de lupulinas e são predominantemente compostos por terpenóides. Este é um importante ingrediente para a indústrias cervejeira pelo fato de conferir aroma e sabor à bebida, já que proporciona uma grande variedade de notas de aroma para as diversas qualidade de cervejas (notas de amadeirado, floral, cítrico, especiarias, frutado, picante, terroso, sulfuroso e herbal). (DURELLO *et al.*, 2019). Os principais componentes químicos identificados no óleo essencial são os terpenos, ácidos amargos e a chalcona (IGLESIAS *et al.*, 2020).

Os polifenóis compreendem de 3% a 6% de toda massa seca dos cones do lúpulo, sendo que estes metabólitos geralmente se concentram nas pétalas do cone (RUIZ-RUIZ *et al.*, 2019). Estes compostos são divididos em quatro grupos: flavonoides, flavan-3ols, ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos. Tais moléculas apresentam propriedade antioxidante, ou seja, a capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio endógenas.

Esses radicais estão envolvidos no estresse oxidativo, sendo que sua ação descontrolada no organismo pode acarretar efeitos deletérios à saúde, como o desenvolvimento de patologias como tumores, diabetes, Alzheimer e Parkinson (KARABÍN *et al.*, 2016a).

3.3 Setor cervejeiro: importância econômica e geração de resíduos

A cerveja é composta por quatro ingredientes principais: água, malte, lúpulo e levedura. Os cones do lúpulo são utilizados pela indústria com o intuito de proporcionar estabilidade microbiológica, espuma, aromas e amargor. Atualmente, no mercado há diversos tipos de lúpulo com diferentes compostos e concentrações de óleos essenciais e resinas que originam bebidas únicas. Ainda, o setor cervejeiro no Brasil tem crescido 23% a cada ano, devido ao aumento das cervejarias artesanais, seguindo a tendência mundial de crescimento deste segmento (GOMES *et al.*, 2021).

Segundo Rachwał *et al.*, (2020a), a cerveja é a quinta bebida mais consumida no mundo e sua comercialização global em 2018 excedeu os 1.94 bilhões de hectolitros, revelando a importância econômica das indústrias cervejeiras. No processo de fabricação da bebida existem diversas etapas até o envasamento como: maltagem, moagem, adição do lúpulo, fermentação, remoção de leveduras, maturação e, concomitante, acontece a geração de uma quantia substancial de resíduos orgânicos e subprodutos dessa cadeia produtiva industrial de larga escala.

De acordo com Kopeć *et al.*, (2021), as cervejarias produzem uma quantidade de sedimentos de filtração que podem variar de 0,55 a 2,61 kg/hL de cerveja, mas com uma média de 1,22 kg/hL. Este filtrado é considerado a maior fonte de resíduo na indústria cervejeira, correspondendo a 7% da massa de grãos utilizados. Ainda, na produção de 1m³ de cerveja são gerados 51,2 kg de resíduos sólidos, incluindo os sedimentos de filtração, o que representa um problema ambiental e econômico local (KOPEĆ *et al.*, 2020).

Nesta produção há pelo menos dois tipos de resíduos associados ao lúpulo que são o *hot trub* e o *spent hops*, decorrentes da técnica *dry hopping*. O *hot trub* é o segundo resíduo sólido obtido, após o processo de fervura, o qual é separado através do método de *whirlpool*. Este biorresíduo apresenta uma composição de substâncias químicas dependente das matérias-primas empregadas, mas que geralmente é de: proteínas (40 a 70%), substâncias amargas (7 a 32%), polifenóis (20 a 30%), carboidratos (4 a 8%), gorduras (1 a 8%), cinzas (menos de 5%), e ácidos amargos (1 a 2%) (STERCZYŃSKA *et al.*, 2021).

Ainda, a constituição do *hot trub* é afetada por diversos fatores como: concentração e grau de solubilização das substâncias do lúpulo; proporção e tipo de adjunto utilizado; processo de secagem; controle do pH; tempo de homogeneização, e fenômeno de oxidação durante a fase de ebulição (SENNA FERREIRA COSTA *et al.*, 2021). Entretanto, 85% dos compostos presentes no lúpulo não são solubilizados pelo processo das cervejarias, e esses se tornam sub-

produtos e necessitam de uma disposição ou uma recuperação adequadas (KERBY; VRIESEKOOOP, 2017).

Diversas tecnologias têm sido aplicadas para o reuso dos sub-produtos agroindustriais com o intuito de reduzir o descarte e minimizar os impactos ambientais. Alguns exemplos são: processo de secagem, extração de componentes fitoquímicos, extração de óleo, microfiltração, hidrólise enzimática, ultrassom e entre outros que podem ser utilizados para a utilização dos resíduos e aproveitamento da composição nutricional e de suas propriedades funcionais (SARAIVA *et al.*, 2019).

3.4 Aplicação da química verde e tecnologias limpas nos métodos de extração

O processo de extração de produtos naturais é utilizado pelo homem desde o descobrimento do fogo pelas populações árabes, gregas, chinesas e até astecas, que aplicavam os métodos extrativos para fins alimentares, medicinais e perfumaria (CHEMAT *et al.*, 2012). As técnicas convencionais consistem na maceração, soxhlet, infusão e decocção. Entretanto, essas metodologias apresentam algumas desvantagens como longos períodos de extração, alto consumo de solventes e energia, custo elevado e grande geração de resíduos (ESPINO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, houve um considerável aumento da preocupação mundial com questões socioambientais pelas consequências geradas das atividades antrópicas. Neste sentido, em 1998, Paul Anastas e John Warner definiram o conceito da Química Verde e os doze princípios para a comunidade científica, com foco na economia de elementos químicos, uso de métodos catalíticos e controle dos efeitos colaterais provocados pelas atividades químicas no meio ambiente (ARMENTA *et al.*, 2019).

O conceito principal da Química Verde está fundamentado no uso das habilidades e conhecimentos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de compostos maléficos durante o planejamento, manufatura e aplicação das substâncias químicas, a fim de minimizar os riscos à saúde humana e à natureza (DE MARCO *et al.*, 2019). Com base neste conceito, diversas metodologias de extração foram desenvolvidas como: extração com líquido pressurizado, em fase sólida, assistida por micro-ondas, assistida por ultrassom, por fluído supercrítico, entre outros. Estas abordagens possuem como vantagens a redução do custo, do consumo energético e do volume de solventes, rapidez e utilização de solventes com menor toxicidade (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015).

A extração por fluído supercrítico consiste na utilização da propriedade termodinâmica do ponto crítico de um fluído que é delimitada pela sua temperatura e pressão, no qual se

denomina pressão crítica, a pressão de vapor do fluído a uma temperatura crítica. Na condição supercrítica, não existe um limite entre a fase líquida-gasosa, conseqüentemente não há tensão superficial, desse modo, o fluído se comporta como uma fase única e retém as propriedades do gás e líquido ao mesmo tempo. Assim, o fluído se difunde na matriz sólida como um gás e dissolve os compostos ativos como um líquido, tendo uma alta eficiência na extração de substâncias fitoquímicas (PANJA, 2018).

REFERÊNCIAS

- ALONSO-ESTEBAN, J. I.; PINELA, J.; BARROS, L.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R. C.; TORIJA-ISASA, E.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERREIRA, I. C. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 154-159, 2019.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.011>
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; DE LA GUARDIA. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248–253, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>
- ASTRAY, G.; GULLÓN, P.; GULLÓN, B.; MUNEKATA, P. E.; LORENZO, J. M. *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. **Applied Sciences**, v. 10, n. 15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10155074>.
- BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD, C.; RIVIÈRE, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry reviews**, v. 17, n. 5, p. 1047-1090, 2018. DOI: [10.1007/s1101-018-9584-y](https://doi.org/10.1007/s1101-018-9584-y)
- CARBONE, K.; MACCHIONI, V.; PETRELLA, G.; CICERO, D. O. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112888, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112888>
- CERUTTI, S.; PACHECO, P. H.; GIL, R.; MARTINEZ, L. D. Green sample preparation strategies for organic/inorganic compounds in environmental samples. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 19, p. 76–86, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.007>
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- COSTA, F. S. F.; AMPARO, T. R.; SEIBERT, J. B.; SILVEIRA, B. M.; DA SILVA, R. G.; PEREIRA, D. I.; BARBOSA, R. G. G.; DOS SANTOS, O. D. H.; BRANDÃO, G. C.; TEIXEIRA, L. F. M.; VIEIRA, P. M. A.; DE SOUZA, G. H. B. Reuse of Hot Trub as an Active Ingredient with Antioxidant and Antimicrobial Potential. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 4, p. 2037–2047, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01163-6>.
- DE MARCO, B. A.; RECHELO, B. S.; TÓTOLI, E. G.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. J. Revisão - Química do Lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>.

ESPINO, M.; FERNÁNDEZ, M. L. A.; GOMEZ, F. J.; BOITEUX, J.; SILVA, M. F. Green analytical chemistry metrics: Towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 438–443, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.007>

GOMES, F. D. O.; GUIMARÃES, B. P.; CEOLA, D.; GHESTI, G. F. Advances in dry hopping for industrial brewing: a review. **Food Science and Technology**, v. 2061, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.60620>.

HRNČIČ, M. K.; ŠPANINGER, E.; KOŠIR, I. J.; KNEZ, Ž.; BREN, U. Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 1–37, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020257>.

IGLESIAS, A.; MITTON, G.; SZAWARSKI, N.; COOLEY, H.; RAMOS, F.; ARCERITO, F. M.; BRASESCO, C.; RAMIREZ, C.; GENDE, L.; EGUARAS, M.; FANOVICH, A.; MAGGI, M. Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against Varroa destructor. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p.113043, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113043>.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 542–567, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>.

KERBY, C.; VRIESEKOOOP, F. An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries. **Beverages**, v. 3, n. 2, p. 24, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages3020024>.

KOPEĆ, M.; MIERZWA-HERSZTEK, M.; GONDEK, K.; WOLNY-KOŁADKA, K.; ZDANIEWICZ, M.; JAROSZ, R. Biological activity of composts obtained from hop waste generated during the brewing. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00746-6>.

KOPEĆ, M.; MIERZWA-HERSZTEK, M.; GONDEK, K.; WOLNY-KOŁADKA, K.; ZDANIEWICZ, M.; SUDER, A. The application potential of hop sediments from beer production for composting. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/su13116409>.

LENOIR, D.; SCHRAMM, K. W.; LALAH, J. O. Green Chemistry: Some important forerunners and current issues. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 18, p. 100313, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100313>

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A. S.; VIAN, M. A.; CHEMAT, F. Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 47, p. 1–11, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007>

LIN, M; XIANG, D.; CHEN, X.; HUO, H. Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 30, p. 8291–8302, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>.

NAGEL, J.; CULLEY, L. K.; LU, Y.; LIU, E.; MATTHEWS, P. D.; STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. **Plant Cell**, v. 20, n. 1, p. 186–200, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055178>.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 173–182, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>

RACHWAŁ, K.; WAŚKO, A.; GUSTAW, K.; POLAK-BERECKA, M. Utilization of brewery wastes in food industry. **PeerJ**, v. 8, p. 1–28, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>.

RUIZ-RUIZ, J. C.; ALDANA, G. D. C. E.; CRUZ, A. I. C.; SEGURA-CAMPOS, M. R. Antioxidant activity of polyphenols extracted from hop used in craft beer. **Biotechnological Progress and Beverage Consumption**, v. 19, p.283-310, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00009-6>.

SARAIVA, B. R.; ANJO, F. A.; VITAL, A. C. P.; SILVA, L. H. M. D.; OGAWA, C. Y. L.; SATO, F.; COIMBRA, L.B.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Waste from brewing (trub) as a source of protein for the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 1247–1255, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14101>.

STERCZYŃSKA, M.; ZDANIEWICZ, M.; WOLNY-KOŁADKA, K. Rheological and microbiological characteristics of hops and hot trub particles formed during beer production. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 1–16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030681>.

TANIGUCHI, Y.; YAMADA, M.; TANIGUCHI, H.; MATSUKURA, Y.; SHINDO, K. Chemical Characterization of Beer Aging Products Derived from Hard Resin Components in Hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 46, p. 10181–10191, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04138>.

4. ARTIGO 1

4. ARTIGO 1

Moléculas bioativas, aplicações biotecnológicas do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) e dos biorresíduos

RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta amplamente utilizada há muitos anos no setor cervejeiro e na medicina tradicional. As plantas femininas produzem inflorescências denominadas por cone, contendo a glândula lupulina capaz de sintetizar importantes metabólitos secundários como: óleo essencial, resinas, polifenóis. Esses compostos apresentam potenciais bioativos (atividade antioxidante, anticarcinogênico, antimicrobiano, anti-inflamatório, entre outros). Além disso, essas substâncias são valorizadas pela indústria cervejeira por agregar notas aromáticas, amargor e outras propriedades. Entretanto, a produção agrícola e a cadeia produtiva de cerveja são responsáveis por gerar um grande volume de biomassa remanescente (folha e caule) e subprodutos (resíduos sólidos cervejeiros) que em sua grande maioria são destinados ao aterro. No entanto, diversos estudos utilizando esses biorresíduos estão apontando como boa fonte de compostos biologicamente ativo e com potencial de diversas aplicações biotecnológicas. Desse modo, essa revisão se propôs realizar um levantamento literário dos últimos dez anos, nos bancos de dados: Scielo, Science Direct, PubMed, com as seguintes palavra-chave: botânica do lúpulo, composição química do lúpulo, bioatividades do lúpulo, potencial biotecnológico do biorresíduo cervejeiro, composição química do resíduo cervejeiro e bioatividade do resíduo cervejeiro.

Palavras-chave: cadeia produtiva sustentável; compostos bioativos; reaproveitamento; sustentabilidade; valorização de subprodutos.

4.1 Introdução

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta trepadeira, perene e dioica. As suas plantas femininas são cultivadas em larga escala, exclusivamente, para a produção dos cones. Esses por sua vez são formados por brácteas e possuem a glândula lupulina que secretam metabólitos como: resinas, polifenóis e óleo essencial, que são de grande interesse da indústria cervejeira que confere a bebida características sensoriais e físicas. Por ser da mesma família da Cannabis (*Cannabaceae*), apresenta uma grande quantidade de compostos com potenciais bioativos, entretanto, essa concentração depende de condições climáticas e até mesmo da variedade cultivada (Schönberger e Kosteletzky, 2011; Calzolari et al., 2017; Hong et al., 2021).

Tradicionalmente, essa planta é considerada como medicinal, e foi utilizada como um fármaco para o tratamento da lepra, tuberculose pulmonar e indigestão. E no século XIX, ela foi amplamente prescrita como um ansiolítico leve e de uso contra o estresse mental e distúrbios do sono (Franco et al., 2012; Rossini et al., 2021). Nesse contexto, as plantas medicinais e seus

compostos bioativos têm se tornado cada vez mais populares, consumidas e até uma tendência entre as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentares por conta de serem excelentes fontes de compostos bioativos (Lorenzo *et al.*, 2019).

Isso pode ser justificado pelo crescente número de estudos *in vivo* e *in vitro* que buscam estabelecer os potenciais efeitos fitoterápicos. Essas pesquisas se mostram cada vez mais importante, por compor a base do conhecimento que permite o desenvolvimento de novos fármacos e suplementos alimentares para a prevenção e tratamento de doenças crônicas tão representativas no mundo atual como: diabetes, doenças cardiovasculares, Alzheimer e até o câncer (Hrnčič *et al.*, 2019).

Esta planta sintetiza diversos compostos com propriedades bioativas reportadas na literatura como os fenólicos, chalconas preniladas, xantohumol, desmetilxantohumol e derivados acilfloroglucinol (α -ácidos e β -ácidos), que apresentam potenciais anticarcinogênico, antibacteriano, anti-inflamatório, entre outros. Além disso, em seu óleo essencial há terpenos e sesquiterpenos que agregam as notas aromáticas à bebida. Os α -ácidos quando isomerizados pela fervura do mosto da cerveja em *iso*- α -ácidos conferem o amargor, já o β -ácidos apresentam propriedades antimicrobiana (Girisa *et al.*, 2021; Kishimoto *et al.*, 2022).

Por outro lado, o cone do lúpulo também é bastante valorizado e utilizado na indústria cervejeira que apresenta um crescimento exponencial assim como a produção da bebida, e isso implica em um severo impacto ambiental devido ao grande volume de resíduos e subprodutos que são gerados. Para a produção de 100 L da bebida são formados em média cerca de 20 kg de resíduos sólidos. Desse grande processamento podem ser formados três tipos diferentes de resíduos sólidos, sendo eles: grão de cevada gasta (GCG), trub quente (TQ) e o resíduo de leveduras (dos Santos Mathias *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2017).

Esses resíduos sólidos apresentam uma composição rica em matéria orgânica e compostos com valores nutricionais significativos como: carboidratos, fibras, proteínas, aminoácidos, vitaminas, compostos fenólicos e minerais (Marson *et al.*, 2020; Sahin *et al.*, 2021). Contudo, na produção agrícola do lúpulo há a geração de um grande volume de biorresíduos, visto que apenas o cone apresenta valor comercial agregado. As folhas e caules formam essa biomassa remanescente e apresentam compostos com propriedades bioativas com potencial de aplicação biotecnológica. Desse modo, se mostram como fontes alternativas e sustentáveis para a recuperação de compostos fitoquímicos com atividade biológica (Marson *et al.*, 2020; del Rio Osorio *et al.*, 2021).

A presente revisão se propôs levantar os estudos dos últimos dez anos por meio de buscas

nos bancos de dados: Scielo, Science Direct, PubMed. Utilizou-se das seguintes palavra-chave: botânica do lúpulo, composição química do lúpulo, bioatividades do lúpulo, potencial biotecnológico do biorresíduo cervejeiro, composição química do resíduo cervejeiro e bioatividade do resíduo cervejeiro.

4.2 Aspectos botânicos do lúpulo

4.2.1 Botânica da espécie

O lúpulo é uma planta que pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Hamamelididae, ordem Urticales, família Cannabaceae, e gênero *Humulus*, no qual compreende cerca de 170 espécies diferentes. Essas plantas são, videiras e possuem tricomas no formato de ganchos que auxiliam na sua adesão em estruturas para o seu crescimento (Ramírez y Viveros, 2021; Carbone y Gervasi, 2022).

O gênero *Humulus* possui três espécies principais: *Humulus japonicus* (HJ), *Humulus yunnanensis* (HY) e *Humulus lupulus* L. (HL). O HJ que também pode ser conhecido pelo sinônimo de *Humulus scandens* é nativo do Japão, Taiwan e China. Já o HY é uma espécie típica da província de Yuunan – China. A origem do lúpulo ainda não está bem estabelecida, entretanto, a presença das três espécies do gênero *Humulus* (HL, HY e HJ) na China fortalece a hipótese que a sua origem tenha ocorrido na Ásia e posteriormente se disseminou para o continente americano e europeu (Iniguez y Zhu, 2021).

Esta planta possui a característica de ser perene, dioica, ou seja, apresenta flor feminina e masculina em plantas diferentes, trepadeira, adaptada aos climas temperados dentro das latitudes de 35° e 55° do hemisfério norte e sul, também podendo atingir mais de 10 metros de altura em estruturas de postes ou sob um sistema de treliça (Tronina *et al.*, 2020).

Os cultivares do hemisfério norte apresentam a particularidade de desempenhar o crescimento em março e encerrar em setembro. Ainda, sua floração acontece entre os meses de junho e julho, a colheita dos cones ocorre, geralmente, em meados de setembro quando os estróbilos atingem o ponto de amadurecimento ideal. No entanto, pode variar dependendo da condição climática e genótipo da planta. Ele se desenvolve bem em diversos tipos de solos, de arenosos a argilosos, mas necessita que seja rico em nutrientes, tenha umidade e pH de 6,0 à 6,5. Entretanto, a resposta de crescimento depende do genótipo do lúpulo, no qual algumas espécies se adaptam melhor as condições pedoclimáticas do que outras (Amoriello, 2019; Amoriello *et al.*, 2020a).

O cultivo dessas espécies requer algumas condições climáticas como: temperatura, fotoperíodo, radiação solar e disponibilidade de água para que se tenha uma boa produtividade.

Em vista disso, algumas técnicas de cultivos podem ser aplicadas (suplementação de luz, fertilização química e irrigação) assim, as condições necessárias para o desenvolvimento da planta podem ser atingidas e consequentemente uma produção de alto rendimento dos cones (Jastrombek *et al.*, 2022).

4.2.2 Planta feminina

As plantas femininas produzem inflorescências denominadas por cone ou estróbilo. Essa estrutura pode apresentar o tamanho que varia de 2,5 a 5,0 cm de comprimento, formado por brácteas membranosas sobrepostas. Além disso, contém glândulas lupulinas responsáveis por secretar uma resina amarela denominada por lupulina, composta por óleo volátil, resinas, flavonoides e taninos (Ponticelli *et al.*, 2021).

O cone é rico em metabólito secundários e os principais compostos encontrados são os ácidos amargos, terpenos e chalconas. Ainda, podem apresentar glicosídeos de flavona (quercetina, rutina, astragalina, rutina e kaempferol) e catequinas (catequina galato e epicatequina galato). Sua resina é formada por diferentes compostos como ácidos amargos que se dividem em dois grupos: α -ácidos (humulonas, co-humulona e ad-humulona) e β -ácidos (lupulona, colupulona e ad-lupulona). Em seu óleo essencial pode incluir diversos componentes voláteis como monoterpenos (mirceno) e sesquiterpenos (humuleno, farnesenos e β -cariofilenos), representando cerca de 82% de todo o conteúdo presente no cone (Kowalska *et al.*, 2022).

Os polifenóis presentes estão agrupados em: flavonides (flavanonas, flavonóis, flavonas, chalconas, entre outros), ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos. Essa rica variedade de compostos são valorizados pela possibilidade de aplicação tecnológicas na indústria farmacêutica por suas propriedades bioativas, e principalmente pelo setor cervejeiro por conta de prover o amargor, notas aromáticas e estabilidade microbiológica (Pistelli *et al.*, 2018; Alonso-Esteban *et al.*, 2019; Kowalska *et al.*, 2022).

4.2.3 Planta masculina

As espécies masculinas geram pequenas flores, compostas por panículas multiramificadas, com comprimento que pode variar entre 7,5 a 12,5 cm, sendo elas responsáveis por produzirem o pólen. Este por sua vez, ao ser disperso pelo vento acaba polinizando os cones femininos e assim gerando sementes. No entanto, essas sementes possuem pouco valor econômico, pelo fato de apresentarem baixo teor de óleos essenciais e resinas.

Porém, as plantas masculinas são essências para o cultivo de novas variedades através do processo de hibridização (Čerenak et al., 2019; Lin et al., 2019).

4.2.4 Partes aéreas da planta (folhas e hastes)

Nos campos de produção comercial, são cultivadas apenas as plantas femininas e suas inflorescências são comercializadas principalmente para o setor cervejeiro. Após o período de colheita as partes aéreas como as folhas e caules são podadas e isso gera um grande volume de biomassa que poderia ser tratado como um biorresíduo pelos produtores. Entretanto, esse material vegetal ainda subexplorado, tem sido apontado por estudos como fonte de compostos bioativos e matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos (Afonso *et al.*, 2021). As aplicações biotecnológicas desse biorresíduo será abordado no decorrer do texto.

4.3 Fitoquímica e bioatividades

4.3.1 Metabólitos primários

O metabolismo primário da planta é responsável por fornecer um conjunto de substâncias para o desenvolvimento, crescimento e reprodução da mesma. Nessa classe pode ser incluído aminoácidos, proteínas, açúcares, lipídios. Na literatura há relatos da presença de diversos metabólitos primários no lúpulo como: alcanos, cetonas, glicose, frutose, maltose, rafinose, sitoesterol, triptodanos (Bocquet *et al.*, 2018a).

4.3.2 Metabólitos secundários

Por definição os metabólitos secundários das plantas não estão necessariamente relacionados ao desenvolvimento da planta, entretanto desempenham um importante papel ecológico e na relação da planta com a natureza. Além disso, contribui na sua defesa e competições vegetais. Em sua grande maioria esse metabólitos apresentam propriedades biológicas e, atualmente, são de grande interesse para as pesquisas científicas. No lúpulo, os metabólitos secundários podem ser observados no cone, com a presença de terpenóides, ácidos amargos, compostos fenólicos, flavonoides e chalconas (Bocquet et al., 2018).

4.3.2.1 Resinas

As resinas do lúpulo podem ser divididas em dois grupos (resina macia e resina dura) com a característica de ser solúvel e insolúvel no hexano, respectivamente. Os ácidos amargos: α -ácidos e β -ácidos compõe a resina macia, que representam 10 a 25% do conteúdo total de um

cone seco. As resinas duras correspondem de 3 a 5% da composição total do cone, essa por sua vez se dividem duas categorias: dura- α e dura- β . Essas frações apresentam propriedades físicas e químicas diferentes, como por exemplo: a resina macia possui uma tonalidade amarelada com aspecto viscoso e denso, já a fração dura se mostra com a cor esverdeada e sólida (Durello *et al.*, 2019; Sanz *et al.*, 2019).

A porção dos α -ácidos, da fração macia, apresenta os seguintes compostos: humulona, cohumulona, adhumulona, pré-humulona e pós-humulona, sendo os três primeiros encontrados em maiores concentrações. Já os β -ácidos é formado por análogos, lupulona, colupulona, adlupulona, pré-lupulona e pós-lupulona. As condições de cultivo, a variedade do lúpulo, clima pode interferir na composição e concentração dessas substâncias (Durello *et al.*, 2019; Sanz *et al.*, 2019).

A resina dura- β compõe majoritariamente a porção total da fração dura. O prenilflavonóide xantohumol (0,3-1,5%) se destaca como o composto em maior concentração verificado na resina dura- β . Esta importante chalcona e inerente ao lúpulo é alvo de estudos em que desempenha significativa propriedades anticarcinogênicas. Dentro dessa classe podem ser apuradas outras chalconas como: desmetilxanthohumol, xantogalenol, 4'-O-metilxanthohumol, 3'-geranilchalconaringenina, 3',5'-diprenilchalconaringenina, 5'-prenilxanthohumol, flavokawina, xanthohumol B, xanthohumol C, xanthohumol D, xanthohumol E, α , β -dihidroxanthohumol e iso-dehidrocicloxantohumol hidratado (Durello *et al.*, 2019).

4.3.2.2 Óleo essencial

As glândulas lupulinas secretam o óleo essencial e este é um dos componentes valorizados pela indústria cervejeira pela capacidade de fornecer notas aromáticas e sabores a bebida. Essa substância pode corresponder de 0,5 a 3% do cone seco, seus componentes podem ser divididos em três grandes grupos: hidrocarbonetos, oxigenados e enxofre. Os hidrocarbonetos é o grupo com maior abundância (representando de 50 a 80% do total) podendo ser encontrados diferentes moléculas como: sesquiterpenos, alifáticos e monoterpenos, sendo esse último presente em maiores concentrações, á exemplo desse estão os α e β -pineno, mirceno e muitos outros. Já, os oxigenados representam cerca de 30 % do total, estão presentes aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres. No grupo do enxofre pode ser observado sulfetos, terpenóides cíclicos, tioésteres, esses são encontrados em menores concentrações, cerca de 1% do total do óleo (Jeliazkova *et al.*, 2018; Rutnik *et al.*, 2021).

4.3.3.3 Polifenóis

Os polifenóis representam um grande grupo de compostos bioativos, sua concentração pode variar de 4 a 14% do conteúdo total do cone (em base seca). Esses compostos são agrupados em: flavonóis, flavan-3-óis, ácidos carboxílicos fenólicos e outros compostos fenólicos. Do primeiro grupo o kaempferol e quercetina se destacam por estar em maior abundância e desempenharam importantes bioatividades. Os compostos (+)-galocatequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, taninos condensados e proantocianidinas estão presentes em maiores concentrações da classe dos flavan-3-óis. No grupo dos ácidos carboxílicos fenólicos, o ácido ferúlico é um dos mais representativos dos compostos que podem ser verificados (Karabín *et al.*, 2016b).

Esses compostos polifenólicos e os demais metabólitos secundários do lúpulo são alvo de estudos em que buscam destacar as propriedades biológicas que esses compostos possuem pelas indústrias farmacêuticas e alimentícia (Tabela 2), com o propósito de prevenir de doenças, aumentar e melhorar o bem-estar da saúde humana. Essas atividades foram evidenciadas em diversos estudos *in vivo*, *in vitro* e *in situ* (Chandrasekara y Shahidi, 2018; González-Salitre *et al.*, 2023).

Tabela 2. Atividades biológicas reportadas com o lúpulo.

Extrato/Composto Isolado	Atividade biológica	Resultados	Referência
Extrato hidroalcoólico 95% (EtOH/água) do cone do lúpulo.	Ensaio do potencial antioxidante <i>in vitro</i> (ABTS, FRAP) do extrato encapsulado em lipossomas.	O extrato encapsulado revelou boa atividade antioxidante com valores de EC50 0,04 mg Trolox/g para o ABTS e EC50 53,43 mg Trolox/g no FRAP.	Lela et al., (2022)
Xantohumol	Teste de inibição do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína <i>in vivo</i> .	O xantohumol inibiu significativamente o vírus nas células Marc-145 e PAMs. Além disso, reduziu o estresse oxidativo induzido pelo próprio vírus ativando a via Nrf2-HMOX1.	Lu et al., (2019)
Xantohumol	Proteção cardiovascular	Pode ser verificado que o xantohumol demonstrou a capacidade de inibir a ativação de fibroblastos cardíacos induzidas por TGF- β 1 via mediação da via de sinalização PTEN/Akt/mTOR.	Jiang et al., (2020)
Extrato hidroalcoólico 60% (EtOH/água) com o cone do lúpulo da variedade Cascade	Ensaio do potencial antimicrobiano	O extrato demonstrou o di poder antibacteriano para todas as cepas bacterianas testadas (<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Cutibacterium acnes</i>), incluindo as multirresistentes, com valores de CIM variando de 1 a 16 μ g/mL, tendo o menor	Lodovico et al., (2020)

		valor de CIM (1 µg/mL) para a <i>C. acnes</i> .	
Extrato purificado de cone do lúpulo da variedade “Nugget”, contendo xantohumol, desmetilxantohumol, cohumulona, humulona, colupulona e lupulona	Ensaio do potencial antimicrobiano	Todos os compostos demonstraram atividade antibacteriana contra as cepa de <i>S. aureus</i> multirresistente. Tendo destaque para a lupulona que demonstrou valores de CIM 0,6 a 1,2 µg/mL para a MRSA.	Bocquet et al., (2019)
Xantohumol	Ensaio oncoprotetivo (Leucemia mieloide crônica)	O estudo demonstrou que o xantohumol teve a capacidade de inibir significativamente a fosforilação da oncoproteína BCR-ABL e diminuir o nível total de BCR-ABL nas células K562. Além disso, revelaram que o composto foi capaz de degradar a oncoproteína, com a ativação da caspase, demonstrando ser uma promissora alternativa para o tratamento oncológico.	Lu et al., (2019)

4.4 Potencial biotecnológico do lúpulo e de seus biorresíduos

4.4.1 Geração dos biorresíduos

Uma das principais aplicações do lúpulo está no processo de produção da cerveja, sendo definida como uma bebida produzida através da fermentação alcoólica de ingredientes como malte, cevada, lúpulo e água, pela ação do fermento adicionado. A cevada pode ser substituída parcialmente por outros tipos de cereais como: milho, arroz, trigo, aveia ou sorgo, com a finalidade de fornecer açúcar para o processo fermentativo, além de gerar características sensoriais diferenciadas ao produto (de Andrade Silva et al., 2023).

Sua origem está atrelada a evidências históricas que revelam que os antigos povos egípcios, babilônios, celtas e eslavos, originariamente, produziam com cevada, aveia, trigo sarraceno, condimentado com várias especiarias e mel. Apenas no século VIII que o lúpulo foi incrementado para a sua produção (DAMJANOVIĆ e VARGA, 2021).

De acordo com Tadei et al., (2020) a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo e a indústria cervejeira vem se destacando neste setor por conta do crescente desenvolvimento de mercado e aumento de sua produção global. O recorde mundial da produção de cerveja ocorreu em 2012 com o registro de 200 bilhões de litros e tendo a China, Estados Unidos e Brasil como os maiores produtores mundiais (Gomes *et al.*, 2022).

O cone do lúpulo pode ser agregado pelas indústrias de diferentes formas, um exemplo disso é o cone inteiro fresco, que originariamente eram utilizadas dessa forma. Entretanto, são poucas as empresas que atualmente a usam pelo curto prazo de validade e sua rápida oxidação e degradação. Por outro lado, os pellets dos cones são bastante empregados, por conta do seu maior tempo de validade e facilitar a extração dos compostos de interesse para a bebida (Gomes *et al.*, 2022).

Os compostos presentes no cone do lúpulo são bastante valorizados no processo de fabricação da cerveja, pois os compostos voláteis presentes no óleo essencial agregam notas aromáticas e sabores. Os compostos não voláteis, como ácido carboxílicos, aminoácidos, resinas, carboidratos e polifenóis, auxiliam na somatização de sabores e na melhora da sensação gustativa final do produto. Além disso, essas substâncias contribuem para a estabilidade da espuma e apresentam propriedade antimicrobiana (Dietz *et al.*, 2020).

No setor cervejeiro o lúpulo pode ser incorporado em alguns dos estágios do preparo. Em sua grande maioria, é acondicionado junto ao mosto antes de fervê-lo, com o intuito de trazer maior amargor, já que os α -ácidos presentes na resina se isomerizam em elevadas temperaturas. Ademais, o lúpulo pode ser adicionado durante o processo de fermentação ou

maturação, no qual essa técnica denominada por “*dry-hopping*” promove consideravelmente o aumento dos aromas na bebida (Vollmer *et al.*, 2017; Lafontaine *et al.*, 2019).

Desta cadeia produtiva são geradas cerca de 173 toneladas de subprodutos para a cada 1000 toneladas de cerveja produzida. Desse resíduo, a porção sólida pode ser verificada a presença 3 principais grupos: trub quente, o grão de cevada gasta e a levedura residual (Figura 2). Após a etapa da primeira filtração do mosto, é formado o grão de cevada gasta. Posteriormente, no mosto é adicionado o lúpulo e esse passa por um processo de fervura e novamente há uma separação no qual é gerado o trub quente, caracterizado por proteínas de alta massa molar coaguladas, compostos fenólicos oxidados e lúpulo. E por fim, há a levedura residual que é resultante da deposição ou flutuação de leveduras ou partículas delas no tanque de fermentação (Amoriello et al., 2020b; de Andrade Silva et al., 2023).

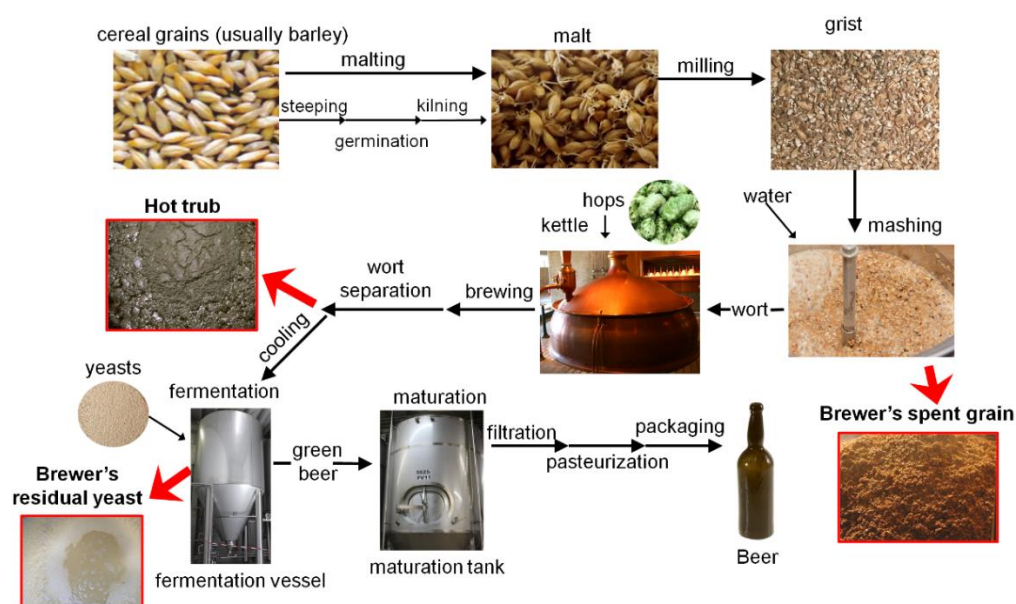


Figura 2. Esquema de produção industrial de cerveja e geração de biorresíduos. Fonte: Rachwał et al., 2020.

O resíduo mais abundante que é gerado pela produção da cerveja é o grão de cevada gasta (GCG), do inglês “*spent barley grain*”, que corresponde a 85% do subproduto total, sendo este formado após o processo de filtragem da mistura do malte e água. Este bioresíduo pode conter cascas dos grãos, grânulos de amido, fibras, componentes lignocelulósicos, proteínas, minerais e vitaminas (Tabela 2) (Almeida et al., 2017; Guido e Moreira, 2017; Olivares-Galván et al., 2022).

A fração proteica do resíduo é formada em sua grande maioria por hordeínas (B, C, D, γ), que pertencem ao grupo das prolaminas. As fibras presentes são compostas majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Os principais aminoácidos

encontrados são valina, alanina, serina, glicina, ácido glutâmico e a leucina (Almeida et al., 2017; Guido e Moreira, 2017; Olivares-Galván et al., 2022).

Antes da etapa de fermentação há um processo de filtração do mosto, que acaba gerando o resíduo denominado por trub quente (TQ) “*hot trub*” ou lúpulo gasto “*spent hops*”. Esse subproduto representa cerca de 0,2 - 0,4 % do mosto, de modo geral, é formado cerca de 0,3 kg trub quente para cada 1 hectolitro de cerveja produzida. No processo de fervura do mosto o lúpulo é adicionado, agregando o amargor característico da bebida, além de incorporar notas aromáticas, estabilizar a espuma, inibir a glicólise e conservação microbiológica (Rachwał et al., 2020).

O TQ apresenta a maior concentração de proteínas dentre todos os resíduos gerados, um valor que pode variar de 20 a 70 %. Também é constituído por um alto valor de compostos fenólicos, sendo os principais caracterizados: catequina, kaempferol, quercetina e as proantocianidinas. Além desses compostos bioativos, α -humuleno, β -mirceno e limoneno também podem ser verificados em sua composição. Os principais aminoácidos relatados na literatura são a leucina, valina, tirosina, lisina e prolina (Karabín et al., 2016b; Karlović et al., 2020; Rachwał et al., 2020).

As leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, ou *S. pastorianus*, são utilizadas no último processo da produção da cerveja, no qual realizam a fermentação de açúcar em etanol e dióxido de carbono. Essas bactérias podem se juntar no fundo do tanque ou em sua superfície e removidos por meio de filtração ou centrifugação. Com essa etapa de recuperação, as leveduras podem ser reutilizadas pelas indústrias no qual é denominado por “*repitching*”. A sua reutilização excessiva pode culminar com efeitos negativos no desempenho do processo fermentativo, perfil sensorial, acúmulo de substâncias que causem a turbidez da bebida e substância indesejadas da fermentação secundária. Esse subproduto é denominado por levedura de cerveja gasta (LCG) “*spent brewer’s yeast*”, sendo o segundo resíduo mais abundante gerado pela indústria cervejeira, representando 10 – 15 % do total. O ácido glutâmico, histidina, alanina e ácido aspártico são as proteínas que foram relatadas neste subproduto, além de outros importantes minerais (Tabela 3) para a saúde humana (Amorim et al., 2016; Sosa-Hernández et al., 2016; Kalayu, 2019; Rachwał et al., 2020; Olivares-Galván et al., 2022).

Tabela 3. Composição química dos resíduos sólidos gerados pela indústria cervejeira.

Compostos	Grão de cevada gasta	Hot trub	Resíduo de Levedura
Umidade (%)	82,6	86,9	86,0
Cinzas (%)	3,8	2,0	5,9
COt (%)	52,3	50,5	45,6
Nt (%)	4,3	8,0	9,1
Pt (%)	26,9	48,8	45,6
C/N	12,1	6,3	5,1
Hemicelulose (%)	19,2 – 26,0	-	-
Lignina (%)	12,0 – 27,8	-	-
Lipídeos (%)	3,0 – 13,5 C	-	~4
Polifenóis (%)	-	5–10	-
Carboidratos (%)	-	4–8	~40
Ácidos graxos (%)	-	1-2	-
Compostos fenólicos (mg/100g)			
Ácido Ferúlico	35-336,3	35-336,3	0,01-9,22
Ácido p-cumárico	6,7-137,3	-	0,01-10,3
Catequina	41,3	82-282	24,6-34,2
Ácido cafeíco	0,8-13,7	-	-
Galocatequina	162,2	-	-
Epigalocatequina	50,6	-	-
Kaempferol	-	52-163	-
Quercetina	-	32-144	-
Proantocianidinas	-	29-88	-
Ácido protocatecuico	-	-	13,1
Ácido gálico	-	-	0,02-2,11
Minerais (mg/100g)			
Fósforo	460-600	-	-
Cálcio	8,2-352	-	16-27
Potássio	70-157	-	6248-9148
Magnésio	-	-	210-273
Sódio	10-31	-	88-1228
Ferro	10-21	-	0,1-12
Zinco	6,7-18	-	4,6-22,6

COt, Carbono Orgânico Total; Nt, Nitrogênio Total; Pt, Proteína Total; C/N, Relação Carbono/Nitrogênio; Dados expressos em base seca. Fonte: Adaptado de dos Santos Mathias et al., 2015; Rodriguez et al., 2023.

4.4.2. Aplicação biotecnológica dos biorresíduos do lúpulo

Na produção do lúpulo há um grande desperdício de subprodutos da planta que são as partes aéreas como as folhas e caules, que representam cerca de dois terço dessa cadeia produtiva e acabam sendo separadas e pouco utilizado. Anualmente, são gerados cerca de 10 a 15 toneladas dessa biomassa residual por hectare de produção, entretanto a aplicação desse subproduto ainda é limitada, em sua maioria são destinados a queima,

para o aterro ou realizado a compostagem. Entretanto, essa matriz vegetal remanescente é fonte de moléculas bioativas como compostos polifenólicos e acil floroglicídeos que ainda são subexplorados (Abram et al., 2015; Astray et al., 2020; Szymańska-Chargot et al., 2022).

Atualmente, os resíduos agroindustriais provindos de plantas estão tendo um destaque no cenário mundial para um reaproveitamento, revalorização e reduzir o volume desse descarte. Diversas possibilidades podem ser realizadas, como a produção de biomateriais, extração de compostos bioativos, suplementação de alimentos, entre outros. A vantagem de se utilizar os subprodutos como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos é que geralmente são gerados em grandes volumes, são de baixo custo e renovável. Na Tabela 4 estão compilados os trabalhos dos últimos cinco anos, desenvolvidos com as possibilidades de aplicação biotecnológica do resíduo remanescente do lúpulo (DOONER, HOHIER, VRIES, 2020).

Tabela 4. Principais trabalhos de aplicações biotecnológicas desenvolvidos com os biorresíduos do *H. lupulus*.

Biorresíduo/Extrato	Potencial biotecnológico	Referência
Extrato aquoso por infusão das folhas e cone do lúpulo da variedade Magnum	O extrato aquoso apresentou atividade antioxidante, tendo o extrato com 80% de folha de lúpulo apresentou a melhor propriedade antioxidante, compostos polifenólicos e propriedade de inibição colinesterásica.	Dziedziński et al., (2020)
Extratos metanólicos da folha de diversas variedades comerciais	A variedade <i>H. neomexicanus</i> revelou em sua composição química altas concentrações de ácido amargo, prenilflavonoide e flavonol glicosídeo, mostrando a possibilidade para explorações desses compostos nas áreas medicinais.	Morcol et al., (2021)
Extrato etanólico e metanólico de folhas das variedades Victoria, Spalt e Cascade	Desenvolvimento de um pesticida contra a bactéria <i>Paenibacillus larvae</i> e o ácaro <i>Varroa destructor</i> , através dos extratos, visto que desempenharam boa atividade contra os estressores bióticos das abelhas.	Iglesias et al., (2020)
Folha do lúpulo	Relataram boa atividade antioxidante e valores de polifenóis totais variando de 0,51 a 6,60 mg ácido gálico/g material, sendo uma boa fonte de antioxidantes promotores da saúde.	Muzykiewicz et al., (2019)
Folha do lúpulo	Os extratos apresentaram atividade antioxidantes com o ensaio do DPPH variando de 103 a 291 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ABTS com valores de 1,15 a 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, isso se deve pela presença de compostos polifenólicos solúveis demonstrando ser uma boa fonte de compostos bioativos.	Macchioni et al., (2022)

Caule do lúpulo	O estudo revelou que este material contém cerca de 29% de celulose, um polímero vegetal valorizado como reforçador de compósitos utilizados para a síntese de materiais de embalagem ou material de construção, e destacaram a possibilidade do reaproveitamento desse biorresíduo como um componente natural reforçador.	Szymańska-Chargot et al., 2022)
Caule do lúpulo	Relataram a presença de 44% de celulose nessa matriz vegetal e sugeriram que esse biorresíduo possa ser reaproveitado como matéria prima para o isolamento de nanofibras de celulose	Kanai et al., (2021)
Nanofibras de celulose oxidadas do caule do lúpulo	Verificaram a aplicabilidade positiva das nanofibras como estabilizante de emulsões Pickering (solução aquosa e oleosa) e apontaram o potencial uso no setor de cosméticos e alimentar.	Kanai et al., (2022)
Caule do lúpulo	Mostraram que esse subproduto é uma boa fonte de celulose e lignina. Por meio dessa matriz desenvolveram um papel e apontaram boa resistência desse produto.	Haunreiter et al., (2021)
Extrato metanólico da folha e caule do lúpulo	Os extratos da parte aérea do lúpulo (<i>Humulus japonicus</i>), desempenharam uma forte atividade inibitória da enzima tirosinase (participa da biossíntese da melanina). Esse potencial está atrelado aos seguintes compostos caracterizados: trans-Ncumaroiltiramina e cis N-cumaroiltiramina com resultados de EC50 de 40,6 e 36,4 µM.	Yang et al., (2018)

Folha do lúpulo	O estudo com as folhas de 5 variedades diferentes de lúpulo da Lituânia demonstrou uma concentração de compostos fenólicos que variou de 1,4–63,6 mg ER/g, tendo a variedade “Fredos derlingieji” com a concentração fenólica mais alta. Ainda, revelou boa atividade antioxidante avaliada pelo teste de DPPH com valores de 34,4–69,5 mg ER/g.	Stanis et al., (2022)
Folha do lúpulo e cone	O extrato metanólico da folha do lúpulo desempenhou boa atividade antioxidante e semelhante ao do cone com valores de FRAP 873.71µM/g (folha) e 926.54 µM/g (cone). Já no ensaio do DPPH obteve resultados de 0.99mg/ml (folha) e 0.78mg/ml (cone). Ainda, demonstraram boa atividade de inibição enzimática de uréase (EC_{50} 0,58 mg/mL para o cone, e 0,87 mg/mL para a folha), acetilcolinesterase (EC_{50} 2,13 e 4,18 mg/mL) e α -amilase (EC_{50} 3,92 e 6,05 mg/mL) podendo ser uma alternativa para o tratamento de úlcera péptica, doença de Alzheimer e diabetes mellitus.	Keskin et al., (2019)

As folhas do lúpulo são fontes de azoto com valores podendo chegar a 40 g/kg e de outros compostos que podem ser observados na Tabela 5, com concentrações semelhantes aos materiais já usados como adubo orgânico, tornando-as interessantes para o processo de compostagem, uma alternativa para a minimização do impacto ambiental (Afonso et al., 2021).

Tabela 5. Composição de macro e micronutrientes presentes em diferentes matérias-primas de compostagem.

	Folhas de lúpulo±DP	Estrume de vaca±DP	Palha de trigo±DP
C/N	19,21	19,95	295,7
Matéria seca (%)	92,1 ± 0,05	93,9 ± 1,14	93,1 ± 0,03
Carbono (g/kg)	472,0 ± 3,73	307,2 ± 70,62	557,8 ± 3,44
Nitrogênio (g/kg)	24,6 ± 0,91	15,4 ± 3,22	1,9 ± 0,07
Potássio (g/kg)	15,3 ± 1,03	19,8 ± 3,97	7,5 ± 0,01
Fósforo (g/kg)	1,2 ± 0,07	3,3 ± 0,43	1,0 ± 0,05
Cálcio (g/kg)	46,5 ± 3,59	8,7 ± 0,46	1,0 ± 0,06
Magnésio (g/kg)	4,4 ± 0,27	14,3 ± 5,33	0,7 ± 0,01
Ferro (mg/kg)	555 ± 323,4	10,843 ± 6201	26,5 ± 2,12
Manganês (mg/kg)	317,7 ± 24,97	269,4 ± 47,5	37,9 ± 1,20
Cobre (mg/kg)	6,5 ± 0,57	49,0 ± 11,3	5,1 ± 0,35
Zinco (mg/kg)	18,8 ± 1,52	87,8 ± 15,4	5,8 ± 0,10
Boro (mg/kg)	62,0 ± 1,66	18,6 ± 2,96	3,0 ± 0,26

C/N Relação carbono nitrogênio. Fonte: Adaptado de Afonso et al., (2021).

4.4.2.1 Abordagens tecnológicas do resíduo cervejeiro

Um dos maiores desafios das cervejarias é a correta gestão dos subprodutos, uma que vez o grande volume de resíduo gerado no final dessa cadeia produtiva promove significativos impacto

econômico e ambiental. O direcionamento desse material ocorre normalmente para o descarte em aterros, mas em alguns casos o GCG pode ser direcionado para a compostagem, fertilização ou ração animal. Já o trub quente e o resíduo de levedura possuem uma aplicabilidade dificultada pela complexidade e particularidade desse conteúdo. No entanto, estudos estão sendo desenvolvidos para estabelecer estratégias de evitar o desperdício dessas biomassas, gerar uma economia circular, sustentável e assim permitindo reduzir os custos do tratamento de resíduos (Ferreira *et al.*, 2019).

A alimentação animal é uma das alternativas da destinação do grão de cevada gasta por possuir grandes teores de proteínas e fibras. Essa incorporação na dieta bovina é benéfica por aumentar a capacidade da produção leiteira e reduzir o nível lipídico no leite (Emmanuel *et al.*, 2022). Já na alimentação humana, Amoriello *et al.*, (2020) fizeram um enriquecimento da farinha comercial com os grãos de cevadas gastos em pó com concentrações diferentes do mesmo (0%, 5% e 10%) na panificação, e isso promoveu o aumento da concentração proteica, fibras dietéticas e lipídeos. Os autores relataram que os produtos de panificação que obtiveram a maior aceitação do público foi a de concentração intermediária (5%). Os benefícios da incorporação do GCG para a saúde humana é a composição de fenólicos (ácido hidroxicinâmico) e alto teores de fibras (arabinoxilanos e β -glucanos) (Maqhuza *et al.*, 2021).

A geração de calor por meio de biomassas como o GCG, com o uso de tecnologias de transformação termoquímica como a combustão e pirólise, é um promissor substrato com valores caloríficos líquido e bruto de 18,64 e 20,14 MJ kg⁻¹ de massa seca, e o calor gerado pela combustão podendo atender às demandas energéticas da indústria cervejeira (Emmanuel *et al.*, 2022).

Bravi *et al.*, (2021) por meio de seu estudo com o resíduo trub quente apontou que o mesmo é fonte de proteínas e fibras (β -glucanos e arabinoxilanos), e há um alto teor de fenólicos totais, que podem ser relacionados como os expressivos resultados antioxidantes relatados, ressaltando a capacidade de transformar esse resíduo em produtos com valor agregado.

Bartmańska *et al.*, (2018) verificaram o potencial antibacteriano e antifúngico do TQ com extratos realizados em diferentes solventes (cloreto de metileno, acetato de etila, acetona e metanol) e posterior isolamento de compostos. A espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium* demonstraram inibição pelos seguintes compostos: α,β -Dihydroxanthohumol, $\alpha,\beta,2',3'$ -Tetrahydroxanthohumol, $2'',3''$ -Dihydroisoxanthohumol, 8-Prenylnaringenin, $4',5'$ -

dihydroxy-6",6"-dimethyl-5",6"-dihydro-4"H-pyrano[2",3":6,7], 4',5-dihydroxy-6",6"-dimethyl-5",6"-dihydro-4"H-pyrano[2",3":6,7]flavanone, entretanto, não tiveram o mesmo resultado com a *Listeria monocytogenes*. Já, os extratos brutos obtidos por acetato de etila, acetona e metanol demonstraram poder de inibição em 50% contra o *Fusarium culmorum*.

O resíduo de leveduras possui alto teor de proteínas de alta qualidade biológica, sendo uma fonte sustentável de proteínas e alternativa para as dietas veganas/vegetarianas. A digestibilidade dessas proteínas é alta quando está é processada por métodos disruptivos e é comparável a proteína provinda de soja. Outra possibilidade relatada é a produção de vitaminas a partir do cultivo das leveduras em meios específicos, em que *Saccharomyces* sp. foi capaz de sintetizar ergosterol, que é precursor da vitamina D2 (ergocalciferol). Já a *S. cerevisiae* por meio da tecnologia da biologia molecular, com alterações genéticas teve a capacidade de sintetizar ácido L-ascórbico a partir de L-galactose (Bertolo *et al.*, 2019).

Ainda, o LCG se mostra como uma opção sustentável e viável tecnologicamente para a aplicação no setor de alimentos, como emulsificante sintético. Nas paredes celulares das leveduras há manoproteínas e D-glucanas que apresentam a propriedade de reter água, com ação espessante, emulsificante e estabilizantes (Araújo *et al.*, 2014). Outro estudo revelou o potencial desse biorresíduo como fonte de polifenóis bioativos, composto por (+)-catequina, ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *trans*-ferúlico, rutina, naringina, quercetina e kaempferol (León-González *et al.*, 2018).

4.5 Considerações finais e perspectivas futuras

Estudos recentes têm destacado o potencial de aplicação do lúpulo e seus subprodutos na área da saúde e biotecnologia. O lúpulo contém compostos chamados de lupulonas e humulonas, que apresentam propriedades anticarcinogênicas, além de compostos antioxidantes, que podem auxiliar na proteção cardiovascular. Além disso, os subprodutos do lúpulo, como as folhas e o caule, também apresentam compostos polifenólicos e flavonoides, com propriedades antioxidantes, que podem ser utilizados na produção de biomateriais. Esses subprodutos também são ricos em fibras e nutrientes, e podem ser utilizados na indústria farmacêutica, alimentar e na alimentação animal. Já, os biorresíduos gerados pelas cervejarias, também apontam como boas fontes de material orgânico, além de apresentarem substâncias com potencial para a aplicação biotecnológica. Portanto, o aproveitamento dos subprodutos do lúpulo gerado pelas cervejarias

pode trazer benefícios tanto para a saúde quanto para a área da biotecnologia, contribuindo para a sustentabilidade e a redução do desperdício na cadeia produtiva, bem como agregando valor ao este subproduto pouco explorado até o momento.

REFERÊNCIAS

- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazić, N., Bucik, V., Možina, S.S., Košir, I.J., Kač, M., Demšar, L., Poklar Ulrih, N., 2015, A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones: *Industrial Crops and Products* 64, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.008>
- Afonso, S., Arrobas, M., Pereira, E.L., Rodrigues, M.Â., 2021, Recycling nutrient-rich hop leaves by composting with wheat straw and farmyard manure in suitable mixtures: *Journal of Environmental Management* 284. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112105>
- Almeida, A. da R., Geraldo, M.R.F., Ribeiro, L.F., Silva, M.V., Maciel, M.V. de O.B., Haminiuk, C.W.I., 2017, Compostos bioativos do bagaço de malte: Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante in vitro: *Acta Scientiarum - Technology* 39(3), 269–277. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i3.28435>
- Alonso-Esteban, J.I., Pinela, J., Barros, L., Ćirić, A., Soković, M., Calhelha, R.C., Torija-Isasa, E., de Cortes Sánchez-Mata, M., Ferreira, I.C.F.R., 2019, Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds: *Industrial Crops and Products* 134, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>
- Amoriello, T., 2019, Multi-criteria approach for land suitability assessment of hop cultivation in Italy *International Journal of Agriculture and Environmental Research* MULTI-CRITERIA APPROACH FOR LAND SUITABILITY ASSESSMENT OF HOP CULTIVATION IN ITALY.:
- Amoriello, T., Fiorentino, S., Vecchiarelli, V., Pagano, M., 2020a, Evaluation of spent grain biochar impact on hop (*Humulus lupulus* L.) growth by multivariate image analysis: *Applied Sciences (Switzerland)* 10(2). <https://doi.org/10.3390/app10020533>
- Amoriello, T., Mellara, F., Galli, V., Amoriello, M., Ciccoritti, R., 2020b, Technological properties and consumer acceptability of bakery products enriched with brewers spent grains: *Foods* 9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101492>
- Amorim, M.M., Pereira, J.O., Monteiro, K.M., Ruiz, A.L., Carvalho, J.E., Pinheiro, H., Pintado, M., 2016, Antiulcer and antiproliferative properties of spent brewer's yeast peptide extracts for incorporation into foods: *Food and Function* 7(5), 2331–2337. <https://doi.org/10.1039/c6fo00030d>

- Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., 2015, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry: TrAC - Trends in Analytical Chemistry 71, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.011>
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F.A., de la Guardia, M., 2019, Green extraction techniques in green analytical chemistry: TrAC - Trends in Analytical Chemistry 116, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>
- Astray, G., Gullón, P., Gullón, B., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., 2020a, *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules: Applied Sciences (Switzerland) 10(15). <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- Astray, G., Gullón, P., Gullón, B., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., 2020b, *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules:, Applied Sciences (Switzerland). <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- Bartmańska, A., Walecka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., Bania, J., Huszcza, E., 2018, Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated there from, and their derivatives: Molecules 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>
- Bertolo, A.P., Biz, A.P., Kempka, A.P., Rigo, E., Cavaleiro, D., 2019, Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility: Journal of Food Science and Technology 56(8), 3697–3706. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3>
- Bocquet, L., Sahrpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., Rivière, C., 2019, Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: New weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains: Molecules 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Bocquet, L., Sahrpaz, S., Hilbert, J.L., Rambaud, C., Rivière, C., 2018a, *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology: Phytochemistry Reviews 17(5), 1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>
- Bocquet, L., Sahrpaz, S., Hilbert, J.L., Rambaud, C., Rivière, C., 2018b, *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity,

- and its biotechnology: *Phytochemistry Reviews* 17(5), 1047–1090. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>
- Bravi, E., de Francesco, G., Sileoni, V., Perretti, G., Galgano, F., Marconi, O., 2021, Brewing by-product upcycling potential: Nutritionally valuable compounds and antioxidant activity evaluation: *Antioxidants* 10(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox10020165>
- Calzolari, D., Magagnini, G., Lucini, L., Grassi, G., Appendino, G.B., Amaducci, S., 2017, High added-value compounds from Cannabis threshing residues: *Industrial Crops and Products* 108, 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.063>
- Carbone, K., Gervasi, F., 2022, An Updated Review of the Genus *Humulus*: A Valuable Source of Bioactive Compounds for Health and Disease Prevention:, *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants11243434>
- Čerenak, A., Kolenc, Z., Sehur, P., Whittock, S.P., Koutoulis, A., Beatson, R., Buck, E., Javornik, B., Škof, S., Jakše, J., 2019, New Male Specific Markers for Hop and Application in Breeding Program: *Scientific Reports* 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50400-z>
- Chandrasekara, A., Shahidi, F., 2018, Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review:, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012, Green extraction of natural products: Concept and principles: *International Journal of Molecular Sciences* 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M.K., 2011, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction: *Ultrasonics Sonochemistry* 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- de Marco, B.A., Rechelo, B.S., Tótolí, E.G., Kogawa, A.C., Salgado, H.R.N., 2019, Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review: *Saudi Pharmaceutical Journal* 27(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>
- del Rio Osorio, L.L., Flórez-López, E., Grande-Tovar, C.D., 2021, The potential of selected agri-food loss and waste to contribute to a circular economy: Applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries:, *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26020515>
- di Lodovico, S., Menghini, L., Ferrante, C., Recchia, E., Castro-Amorim, J., Gameiro, P., Cellini, L., Bessa, L.J., 2020, Hop Extract: An Efficacious Antimicrobial and Anti-biofilm Agent

- Against Multidrug-Resistant Staphylococci Strains and Cutibacterium acnes: *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01852>
- Dietz, C., Cook, D., Huismann, M., Wilson, C., Ford, R., 2020, The multisensory perception of hop essential oil: a review:, *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.622>
- dos Santos Mathias, T.R., Alexandre, V.M.F., Cammarota, M.C., de Mello, P.P.M., Sérvulo, E.F.C., 2015, Characterization and determination of brewer's solid wastes composition: *Journal of the Institute of Brewing* 121(3), 400–404. <https://doi.org/10.1002/jib.229>
- Durello, R.S., Silva, L.M., Bogusz, S.J., 2019, Revisão - Química do Lúpulo: *Química Nova* 42(8), 900–919.
- Dziedziński, M., Szczepaniak, O., Telichowska, A., Kobus-Cisowska, J., 2020, Antioxidant capacity and cholinesterase inhibiting properties of dietary infusions with *Humulus lupulus*: *Journal of Elementology* 25(2), 657–673. <https://doi.org/10.5601/jelem.2020.25.1.1913>
- Emmanuel, J.K., Nganyira, P.D., Shao, G.N., 2022, Evaluating the potential applications of brewers' spent grain in biogas generation, food and biotechnology industry: A review:, *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11140>
- Espino, M., Fernández, M. de los Á., Gomez, F.J.V., Boiteux, J., Silva, M.F., 2018, Green analytical chemistry metrics: Towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants: *Microchemical Journal* 141(June), 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.06.007>
- Ferreira, S., Monteiro, E., Brito, P., Castro, C., Calado, L., Vilarinho, C., 2019, Experimental analysis of brewers' spent grains steam gasification in an allothermal batch reactor: *Energies* 12(5). <https://doi.org/10.3390/en12050912>
- Franco, L., Sánchez, C., Bravo, R., Rodríguez, A.B., Barriga, C., Romero, E., Cubero, J., 2012, The sedative effect of non-alcoholic beer in healthy female nurses: *PLoS ONE* 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037290>
- Girisa, S., Saikia, Q., Bordoloi, D., Banik, K., Monisha, J., Daimary, U.D., Verma, E., Ahn, K.S., Kunnumakkara, A.B., 2021, Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment:, *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.2522>
- Gomes, F. de O., Guimarães, B.P., Ceola, D., Ghesti, G.F., 2022, Advances in dry hopping for industrial brewing: a review:, *Food Science and Technology (Brazil)*. <https://doi.org/10.1590/fst.60620>

- GOMES, F. de O., GUIMARÃES, B.P., CEOLA, D., GHESTI, G.F., 2021, Advances in dry hopping for industrial brewing: a review: Food Science and Technology 2061. <https://doi.org/10.1590/fst.60620>
- Gonçalves, G. da C., Nakamura, P.K., Furtado, D.F., Veit, M.T., 2017, Utilization of brewery residues to produce granular activated carbon and bio-oil: Journal of Cleaner Production 168, 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.089>
- González-Salitre, L., Guillermo González-Olivares, L., Antobelli Basilio-Cortes, U., 2023, *Humulus lupulus* L. a potential precursor to human health: High hops craft beer:, Food Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134959>
- Guido, L.F., Moreira, M.M., 2017, Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain Polyphenols: a Review:, Food and Bioprocess Technology. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1913-4>
- Haunreiter, K.J., Dichiaro, A., Gustafson, R., 2021, Structural and chemical characterization of hop bine fibers and their applications in the paper industry: Industrial Crops and Products 174. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114217>
- Hong, K., Wang, L., Johnpaul, A., Lv, C., Ma, C., 2021, Key enzymes involved in the synthesis of hops phytochemical compounds: From structure, functions to applications:, International Journal of Molecular Sciences. <https://doi.org/10.3390/ijms22179373>
- Hrnčič, M.K., Španinger, E., Košir, I.J., Knez, Ž., Bren, U., 2019a, Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects: Nutrients 11(2), 1–37. <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Hrnčič, M.K., Španinger, E., Košir, I.J., Knez, Ž., Bren, U., 2019b, Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects:, Nutrients. <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Iglesias, A., Mitton, G., Szawarski, N., Cooley, H., Ramos, F., Meroi Arcerito, F., Brasesco, C., Ramirez, C., Gende, L., Eguaras, M., Fanovich, A., Maggi, M., 2020, Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against *Varroa destructor*: Industrial Crops and Products 158(October), 113043. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113043>
- Iniguez, A.B., Zhu, M.J., 2021, Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases:, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767537>

- Jastrombek, J.M., Faguerazzi, M.M., de Cássio Pierezan, H., Rufato, L., Sato, A.J., da Silva Ricce, W., Marques, V.V., Leles, N.R., Roberto, S.R., 2022, Hop: An Emerging Crop in Subtropical Areas in Brazil, *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050393>
- Jeliazkova, E., Zheljaskov, V.D., Kačániova, M., Astatkie, T., Tekwani, B.L., 2018, Sequential elution of essential oil constituents during steam distillation of hops (*Humulus lupulus* L.) and influence on oil yield and antimicrobial activity: *Journal of Oleo Science* 67(7), 871–883. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17216>
- Jiang, C., Xie, N., Sun, T., Ma, W., Zhang, B., Li, W., 2020, Xanthohumol inhibits tgf- β 1-induced cardiac fibroblasts activation via mediating pten/akt/ mtor signaling pathway: *Drug Design, Development and Therapy* 14, 5431–5439. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S282206>
- Kalayu, G., 2019, Serial re-pitching: its effect on yeast physiology, fermentation performance, and product quality:, *Annals of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01493-4>
- Kanai, N., Nishimura, K., Umetani, S., Saito, Y., Saito, H., Oyama, T., Kawamura, I., 2021, Upcycling of Waste Hop Stems into Cellulose Nanofibers: Isolation and Structural Characterization: *ACS Agricultural Science and Technology* 1(4), 347–354. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00041>
- Kanai, N., Sakai, T., Yamada, K., Kumagai, S., Kawamura, I., 2022, Using cellulose nanofibers isolated from waste hop stems to stabilize dodecane or olive oil-in-water Pickering emulsions: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 653. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129956>
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., Dostálek, P., 2016a, Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(3), 542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., Dostálek, P., 2016b, Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(3), 542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>
- Karlović, A., Jurić, A., Ćorić, N., Habschied, K., Krstanović, V., Mastanjević, K., 2020, By-products in the malting and brewing industries-re-usage possibilities:, *Fermentation*. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6030082>

- Kerby, C., Vriesekoop, F., 2017, An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries: *Beverages* 3(2), 24. <https://doi.org/10.3390/beverages3020024>
- Keskin, Şirin, Y., Çakir, H.E., Keskin, M., 2019, An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes: *South African Journal of Botany* 120, 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.017>
- Kishimoto, T., Teramoto, S., Fujita, A., Yamada, O., 2022, Evaluation of Components Contributing to the International Bitterness Unit of Wort and Beer: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 80(1), 53–61. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1878684>
- Kopeć, M., Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Wolny-Koładka, K., Zdaniewicz, M., Jarosz, R., 2020, Biological activity of composts obtained from hop waste generated during the brewing: *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00746-6>
- Kopeć, M., Mierzwa-hersztek, M., Gondek, K., Wolny-koładka, K., Zdaniewicz, M., Suder, A., 2021, The application potential of hop sediments from beer production for composting: *Sustainability (Switzerland)* 13(11). <https://doi.org/10.3390/su13116409>
- Kowalska, G., Bouchentouf, S., Kowalski, R., Wyrostek, J., Pankiewicz, U., Mazurek, A., Sujka, M., Włodarczyk-Stasiak, M., 2022, The hop cones (*Humulus lupulus* L.): Chemical composition, antioxidant properties and molecular docking simulations: *Journal of Herbal Medicine* 33. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100566>
- Lafontaine, S., Varnum, S., Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Vollmer, D., Kishimoto, T., Shellhammer, T., 2019, Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping: *Food Chemistry* 278, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>
- Lela, L., Ponticelli, M., Caddeo, C., Vassallo, A., Ostuni, A., Sinisgalli, C., Faraone, I., Santoro, V., de Tommasi, N., Milella, L., 2022, Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract: *Food Chemistry* 393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133401>
- León-González, M.E., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., Madrid-Albarrán, Y., 2018, Residual brewing yeast as a source of polyphenols: Extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools: *Food Chemistry* 267, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.141>

- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Chemat, F., 2013, Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry: TrAC - Trends in Analytical Chemistry 47, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007>
- Lin, M., Xiang, D., Chen, X., Huo, H., 2019a, Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health: Journal of Agricultural and Food Chemistry 67(30), 8291–8302. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>
- Lin, M., Xiang, D., Chen, X., Huo, H., 2019b, Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health: Journal of Agricultural and Food Chemistry 67(30), 8291–8302. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03780>
- Lorenzo, J.M., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Marszałek, K., Eş, I., Munekata, P.E.S., Ferreira, I.C.F.R., Barba, F.J., 2019, Understanding the potential benefits of thyme and its derived products for food industry and consumer health: From extraction of value-added compounds to the evaluation of bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities:, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1477730>
- Lu, X., Geng, J., Zhang, J., Miao, J., Liu, M., 2019, Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops, induces caspase-dependent degradation of oncoprotein BCR-ABL in K562 cells: Antioxidants 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090402>
- Macchioni, V., Picchi, V., Carbone, K., 2022, Hop leaves as an alternative source of health-active compounds: Effect of genotype and drying conditions: Plants 11(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010099>
- Maqhuzu, A.B., Yoshikawa, K., Takahashi, F., 2021, Prospective utilization of brewers' spent grains (BSG) for energy and food in Africa and its global warming potential: Sustainable Production and Consumption 26, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2020.09.022>
- Marson, G.V., de Castro, R.J.S., Belleville, M.P., Hubinger, M.D., 2020, Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: a systematic review on its characteristics, processing and potential applications:, World Journal of Microbiology and Biotechnology. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02866-7>
- Morcol, T.B., Matthews, P.D., Kennelly, E.J., 2021, Differences in Leaf Chemistry and Glandular Trichome Density between Wild Southwestern American Hop (*Humulus neomexicanus*) and

- Commercial Hop Cultivars: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(27), 7798–7814. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02710>
- Muzykiewicz, A., Nowak, A., Zielonka-Brzezicka, J., Florkowska, K., Duchnik, W., Klimowicz, A., 2019, Comparison of antioxidant activity of extracts of hop leaves harvested in different years:, *Herba Polonica*. <https://doi.org/10.2478/hepo-2019-0013>
- Nagel, J., Culley, L.K., Lu, Y., Liu, E., Matthews, P.D., Stevens, J.F., Page, J.E., 2008, EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol: *Plant Cell* 20(1), 186–200. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055178>
- Olivares-Galván, S., Marina, M.L., García, M.C., 2022, Extraction of valuable compounds from brewing residues: Malt rootlets, spent hops, and spent yeast:, *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.002>
- Panja, P., 2018, Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials: *Current Opinion in Food Science* 23, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Pistelli, L., Ferri, B., Cioni, P.L., Koziara, M., Agacka, M., Skomra, U., 2018, Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars: *Industrial Crops and Products* 124, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.009>
- Ponticelli, M., Russo, D., Faraone, I., Sinisgalli, C., Labanca, F., Lela, L., Milella, L., 2021, The promising ability of *Humulus lupulus* L. Iso- α -acids vs. diabetes, inflammation, and metabolic syndrome: A systematic review:, *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules26040954>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., Polak-Berecka, M., 2020a, Utilization of brewery wastes in food industry: *PeerJ* 8, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., Polak-Berecka, M., 2020b, Utilization of brewery wastes in food industry: *PeerJ* 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>
- Ramírez, A., Viveros, J.M., 2021, Brewing with *Cannabis sativa* vs. *Humulus lupulus*: a review:, *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.654>
- Rodriguez, L.M., Camina, J.L., Borroni, V., Pérez, E.E., 2023, Protein recovery from brewery solid wastes:, *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134810>
- Rossini, F., Virga, G., Loreti, P., Iacuzzi, N., Ruggeri, R., Provenzano, M.E., 2021, Hops (*Humulus lupulus* L.) as a novel multipurpose crop for the mediterranean region of europe: Challenges

- and opportunities of their cultivation: *Agriculture (Switzerland)* 11(6).
<https://doi.org/10.3390/agriculture11060484>
- Ruiz-Ruiz, J.C., Aldana, G. del C.E., Cruz, A.I.C., Segura-Campos, M.R., 2019, Antioxidant activity of polyphenols extracted from hop used in craft beer, *Biotechnological Progress and Beverage Consumption: Volume 19: The Science of Beverages: Elsevier Inc.*, 283–310 p.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00009-6>
- Rutnik, K., Knez Hrnčič, M., Jože Košir, I., 2021, Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications:, *Food Reviews International*.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1874413>
- Sahin, A.W., Hardiman, K., Atzler, J.J., Vogelsang-O'Dwyer, M., Valdeperez, D., Münch, S., Cattaneo, G., O'Riordan, P., Arendt, E.K., 2021, Rejuvenated Brewer's Spent Grain: The impact of two BSG-derived ingredients on techno-functional and nutritional characteristics of fibre-enriched pasta: *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 68.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102633>
- Sanz, V., Torres, M.D., López Vilariño, J.M., Domínguez, H., 2019, What is new on the hop extraction?, *Trends in Food Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>
- Saraiva, B.R., Anjo, F.A., Vital, A.C.P., Silva, L.H.M. da, Ogawa, C.Y.L., Sato, F., Coimbra, L.B., Matumoto-Pintro, P.T., 2019, Waste from brewing (trub) as a source of protein for the food industry: *International Journal of Food Science and Technology* 54(4), 1247–1255.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.14101>
- Schönberger, C., Kosteletzky, T., 2011, 125th anniversary review: The role of hops in brewing:, *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Senna Ferreira Costa, F., Roquete Amparo, T., Brandão Seibert, J., Silveira, B.M., Gomes da Silva, R., Inocêncio Pereira, D., Gontijo Garcia Barbosa, R., dos Santos, O.D.H., Brandão, G.C., de Medeiros Teixeira, L.F., Melo de Abreu Vieira, P., Bianco de Souza, G.H., 2021, Reuse of Hot Trub as an Active Ingredient with Antioxidant and Antimicrobial Potential: *Waste and Biomass Valorization* 12(4), 2037–2047. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01163-6>
- Sosa-Hernández, O., Parameswaran, P., Alemán-Nava, G.S., Torres, C.I., Parra-Saldívar, R., 2016, Evaluating biochemical methane production from brewer's spent yeast: *Journal of Industrial*

- Microbiology and Biotechnology 43(9), 1195–1204. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1792-0>
- Stanis, Ž., Dūdėnas, M., Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Skrzydlewska, E., Drevinskas, T., Ragažinskienė, O., Obelevičius, K., Maruška, A., 2022, Analysis of the Leaves and Cones of Lithuanian Hops (*Humulus lupulus* L.) Varieties by Chromatographic and Spectrophotometric Methods: *Molecules* 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092705>
- Sterczyńska, M., Zdaniewicz, M., Wolny-Koładka, K., 2021, Rheological and microbiological characteristics of hops and hot trub particles formed during beer production: *Molecules* 26(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030681>
- Szymańska-Chargot, M., Cieśla, J., Pękala, P., Pieczywek, P.M., Oleszek, W., Żyła, M., Szkopek, Z., Zdunek, A., 2022, The Influence of High-Intensity Ultrasonication on Properties of Cellulose Produced from the Hop Stems, the Byproduct of the Hop Cones Production: *Molecules* 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092624>
- Tadei, N.S., Silva, N.C.C., Iwase, C.H.T., Rocha, L.O., 2020, Fusarium mycotoxins in beer production: Characteristics, toxicity, incidence, legislation, and control strategies: *Scientia Agropecuaria* 11(2), 247–256. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.02.13>
- Taniguchi, Y., Yamada, M., Taniguchi, H., Matsukura, Y., Shindo, K., 2015, Chemical Characterization of Beer Aging Products Derived from Hard Resin Components in Hops (*Humulus lupulus* L.): *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(46), 10181–10191. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04138>
- Tronina, T., Popłonski, J., Bartmanska, A., 2020, Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer:, *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25184201>
- Vicente de Andrade Silva, G., Demaman Arend, G., Antonio Ferreira Zielinski, A., di Luccio, M., Ambrosi, A., 2023, Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review:, *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134629>
- Vollmer, D.M., Algazzali, V., Shellhammer, T.H., 2017, Aroma properties of lager beer dry-hopped with oxidized hops: *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 75(1), 22–26. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-1287-01>
- Yang, H.H., Oh, K.E., Jo, Y.H., Ahn, J.H., Liu, Q., Turk, A., Jang, J.Y., Hwang, B.Y., Lee, K.Y., Lee, M.K., 2018, Characterization of tyrosinase inhibitory constituents from the aerial parts

of *Humulus japonicus* using LC-MS/MS coupled online assay: Bioorganic and Medicinal Chemistry 26(2), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.011>

NORMAS DA REVISTA

O **BOLETIM LATINO-AMERICANO E CARIBE DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS** (BLACPMA) (ISSN 0717 7917), é uma revista científica internacional publicada bimestralmente, que desde 2020 pertence à Editorial MS-Editions (Santiago, Chile), entidade que começará gradativamente a colocar um selo diferente e uma nova nuance, com algumas mudanças importantes, mas que não pretende modificar a filosofia ou a abordagem científica da revista.

1. TIPOS DE CONTRIBUIÇÃO

Artigos Originais: manuscritos originais de pesquisa. A revista considerará todos os manuscritos de pesquisa originais, desde que o artigo relate experimentos cientificamente sólidos e forneça uma quantidade substancial de novas informações, sem limite de tamanho, em espanhol ou inglês.

Artigos de Revisão: fornecem atualizações concisas e precisas sobre os últimos avanços em uma área específica de pesquisa, relacionados aos temas abordados pela revista, sem limite de extensão, apenas em inglês.

Artigos de Opinião: são comentários sobre um tema contingente atual, cujos autores são no máximo três, com no máximo 25 referências onde 75% são dos últimos 2 anos, não citarão teses ou páginas da web, todos em inglês. Serão avaliados rapidamente e terão preferência para publicação.

Artigos Convidados: são artigos que serão especiais pelo seu conteúdo, ou por outro motivo, serão avaliados como qualquer outro artigo e terão preferência de publicação. Eles podem ser escritos em espanhol ou inglês.

2. RECOMENDAÇÕES IMPORTANTES

Serão aceitos estudos de isolamento de compostos de estrutura conhecida de novas fontes vegetais, somente quando justificados pelo uso etnobotânico de espécies vegetais.

Não serão considerados estudos que avaliem as propriedades biológicas de um extrato, sem uma caracterização fitoquímica adequada. Como exemplo, extratos de compostos fenólicos devem ser totalmente caracterizados por HPLC usando padrões ou HPLC ou HPLC-MS.

Não serão considerados estudos sobre plantas medicinais com determinação de atividade biológica não relacionada ao uso etnofarmacológico da espécie vegetal.

A publicação da determinação *in vitro* do efeito antioxidante de extratos vegetais não será considerada. O Comitê Científico pode abrir exceções se os extratos forem provenientes de plantas medicinais não estudadas e totalmente caracterizados (por exemplo, HPLC ou HPLC-MS).

A identificação dos componentes do óleo essencial (EA) deve incluir todos os dados de análise, o índice de retenção (IR) calculado e sua comparação com os valores da literatura. O EA estudado deve estar associado às propriedades medicinais da planta estudada ou à hipótese desenvolvida na introdução. Não serão aceitos trabalhos que correspondam a "exercícios analíticos".

Não serão aceitos trabalhos com determinação de atividade antimicrobiana com dose única. É necessário incluir a concentração inibitória mínima (CIM).

Não serão aceitos trabalhos fragmentados, uma nova propriedade biológica de um extrato previamente estudado, do qual propriedades biológicas relacionadas (por exemplo, propriedades antibacterianas) foram publicadas.

3. FORMATO DE CONTRIBUIÇÃO

Os trabalhos serão submetidos em formato Microsoft Word .

Os artigos serão compostos por:

Qualificação

Resumo

Palavras chaves

Introdução

Material e métodos

Resultados

Discussão

Conclusões

Referências

3.1. Primeira página:

Título do trabalho: (em espanhol e inglês), o título deve ser curto, mas indicar do que se trata o artigo.

Autores: Nome e sobrenome de todos os autores (exemplo: Paul A. Reyes), instituição a que pertencem (Departamento, Faculdade, Universidade, Cidade, País). Nome e e-mail do autor correspondente.

Resumo: Resumo em espanhol e inglês de no máximo 150 palavras e incluir uma descrição mínima como introdução, os métodos utilizados, os resultados relevantes e as conclusões. Não deve incluir referências.

Palavras-chave: 5 no total (não menos que 5 e não mais que 5).

3.2. Texto:

Artigos originais: serão constituídos de Introdução, Materiais e Métodos (descrição extensa), Resultados (referentes a tabelas e figuras), Discussão (extensão livre) e Conclusões (o mais breve possível).

Artigos de Revisão: somente em inglês, serão estruturados de acordo com a necessidade do autor. O nome latino completo da espécie e da família (por exemplo, *Inula viscosa* (L.) Aiton. Asteraceae) deve ser mencionado por completo pelo menos na seção de Materiais. Ao longo do trabalho será utilizado apenas o nome latino abreviado (*viscosa*).

Tabelas: Devem ser escritas em processador de Word. Por favor, não use linhas que não sejam linhas pretas de 1 pt. O texto deve ser em Times New Roman 10. Incluir sempre o Título (numerado e citado no trabalho) e a legenda das abreviaturas, nos casos em que corresponda.

Figuras: Inclua as referências separadamente (não inclua as legendas na figura). A imagem é aceita em qualquer um dos seguintes formatos (JPEG, JPG; GIF, BMP ou TIFF). No entanto, evite TIFF se for muito grande e GIF se a imagem for de baixa qualidade. Não há restrições quanto ao número e cor das figuras, mas a inclusão de qualquer figura deve ser justificada. Não é possível postar uma imagem que foi copiada de outro post. Só é possível publicar cópias de imagens livres de direitos autorais, caso contrário, elas devem ser redesenhadas com um programa adequado. Você pode

encontrar versões gratuitas na Internet. Sugerimos: • MarvinSketch (para Windows e outros sistemas) (download gratuito após registro) <http://www.chemaxon.com/product/msketch.html> EasyChem para MacOS http://sourceforge.net/project/showfiles.php?group_id=90102

Artigos de opinião: somente em inglês, sem resumo e partes normais de um artigo, refletirão principalmente a opinião pessoal do(s) autor(es) com base na literatura científica, objeto de contingência internacional. Máximo de 25 referências, 75% dos últimos dois anos; extensão máxima de 4 páginas sem referências.

4. REFERÊNCIAS

4.1. Citações:

As citações no texto devem incluir o sobrenome do autor e o ano, separados por vírgulas e colocados entre parênteses (eg Reyes, 1995); se houver mais de uma obra do mesmo autor, serão separadas por vírgulas (ex. Reyes, 1987, 1995, 2001). Se houver dois autores, eles serão citados separados por "e" ou equivalente, respeitando o idioma original da fonte. Se houver mais de dois autores, apenas o primeiro seguido da expressão et al.

Já na seção de referências devem constar todos os autores. Se houver vários trabalhos do mesmo autor e ano, eles serão citados com uma letra sequencial anexada ao ano (exemplo: Mayer et al., 1987a, 1987b). A referência incluirá APENAS as referências citadas no texto, ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, sem numeração precedente e sem recuo. Sobrenome(s) do(s) autor(es) seguido(s) das iniciais do nome, sem pontos ou separação entre eles.

O nome da revista será abreviado de acordo com os padrões ISO ou Pubmed Journals Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Journal> ISO abbreviation) que oferece a possibilidade de confirmar a nome online, nome e abreviação de um grande número de revistas. Por fim, será citado o volume da publicação, seguido do número entre parênteses, dois pontos e o número de páginas de x a y, sem espaços entre eles. Você deve indicar o Doi quando aplicável. As citações de livros devem especificar as páginas consultadas, bem como o ano, cidade e país de publicação. Citações incompletas não serão aceitas e o descumprimento dessas regras fará com que o artigo seja adiado até que seja corrigido

4.1.1. Modelos de publicações periódicas:

Cai LS, Gong SL, Chen M, Wu CY. 2006. Éter de coroa de vinil como uma nova fibra SPME sol-gel reticulada radical para determinação de pesticidas organofosforados em amostras de alimentos. *Anal Chim Act* 559 (1): 89-96.

5. ARTIGO 2

Supercritical fluid-assisted extraction of hop cone residue from craft breweries

Abstract

This study aimed to use supercritical fluid-assisted extraction in hop cone residue from craft breweries and define the best extraction parameters considering yield, compounds extracted, in vitro chemical and cell-based antioxidant potential besides antimicrobial and cytotoxic potentials. The variables studied were temperature (40-60 °C), pressure (100-200 Bar), and ethanol percentage as co-solvent (5-10%) using a Taguchi experimental design (11 runs). The extracts showed inhibitory action towards Gram-positive and Gram-negative bacteria, mainly *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis* (MICs = 5–10 mg/mL). Furthermore, they showed no hepatotoxicity on a health porcine liver cell line (PLP2) up to the maximum tested concentration (400 µg/mL), indicating safety for food and pharmacological applications. Lower temperatures (40 °C), pressures (100 bar), and ethanol percentages (5%) resulted in higher concentrations of some compounds (alpha-copaene, γ -elemene, γ -muurolene, α -muurolene, caryophyllene oxide) and higher antioxidant activity in cell-based assays, but lower yields. At the same time, lower temperatures (40 °C) and pressures (100 bar) but higher ethanol percentages (10%) resulted in higher concentrations of other compounds (nerolidyl acetate, linalyl isobutyrate, α -acorenol, and geranyl isovalerate) and increased antioxidant activity in chemical systems. Our results support that the hop cone residue can be used to obtain supercritical fluid-assisted extracts with biological potentialities that might virtually be upcycled into multifunctional ingredients for the food and pharmacological; being advisable to use 40 °C, 100 bar, and 5 or 10% ethanol percentage as process parameters.

Keywords: pressurized fluids, co-solvent, brewery residue, health extracts, green extraction.

5.1 Introduction

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a dioecious, climbing, and perennial plant that belongs to the *Cannabaceae* family. Its cultivation generally occurs in temperate regions around the world. The female plant produces an inflorescence called a cone, formed by bracts and containing the lupulin gland. This gland can synthesize secondary compounds such as essential oil, bitter acids, and polyphenols with bioactive properties [1,2,3].

Traditional medicine has used the hop cone for many years to treat gastric diseases, fever, insomnia, anxiety, and stress [4]. In addition, in the literature, it is possible to observe studies reporting antioxidant [5], antimicrobial [6], and antifungal potential [7] for the presented compounds.

The hop cone is overvalued in brewing because it adds bitterness, aromatic notes, foam stability, and microbiological control to beer. Currently, beer is the most consumed alcoholic

beverage in the world [8,9]. Its production chain generates a large volume of solid waste. To produce 1 m³ of beer, around 51.2 kg of solid by-products are generated, representing a great environmental impact. In this way, these residues, including hop cones, can have compounds with interesting nutritional values and potential [10,11].

The most used methodologies for obtaining oils and extracts from residues are steam distillation and the utilization of organic solvents. The distillation process uses high temperatures, which can reduce the final product's quality and degrade thermolabile substances. The use of solvents requires separation processes for solvent removal, which mostly have toxic characteristics, and compounds may be lost during this separation process [12].

On the other hand, emerging methodologies, such as supercritical fluid-assisted extraction, prove to be an alternative since the technique uses fluids at temperatures and pressure above their critical point, reaching their supercritical state. They allowed the employed solvents to easily diffuse through the plant matrix, thus extracting the target compounds more efficiently. In addition, milder temperatures are used, and it is possible to prioritize the extraction of a given compound by adjusting the temperature, pressure, and solvent [13,14].

Carbon dioxide (CO₂) is the main solvent used for this methodology because it has a relatively low cost, is non-toxic, non-flammable, does not leave chemical residues in the extract, and has a non-polar characteristic. Therefore, it can extract the soft resin and its substances responsible for the aromatic notes from the hop matrix. Furthermore, adding ethanol to this process can lead to greater heterogeneity of compounds and polyphenols in the extract due to its polar and non-toxic characteristics [15-17].

Previous studies have characterized extracts from hop cones using conventional extraction techniques [18,19]. However, only one study used supercritical fluids for extracts of hop cone [20]. Still, the raw material was not a residual from the brewery, and no *in vitro* antioxidant potential was evaluated. Therefore, this study aimed to use supercritical fluid-assisted extraction in hop cone residue from craft breweries and define the best extraction parameters considering yield, compounds extracted by chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), *in vitro* and chemical and cell-based antioxidant activities, besides antimicrobial and cytotoxic potential.

5.2 Material and methods

5.2.1 Sample

The hop cone residue of the Centennial variety (Yakima Chief Hops®), used by an artisanal brewery located in the city of Maringá-PR, was provided for the study. This residue was lyophilized at -86 °C, crushed in a knife mill, vacuum-packed, protected from light, and stored at a temperature of -24 °C until the extraction process.

5.2.2 Extraction assisted by Supercritical Fluid

The extraction of hop residue was performed using the experimental apparatus shown in Figure 3. This apparatus consists of two high-pressure syringe pumps (Teledyne ISCO, Model 500D, Lincoln, Nebraska, USA) connected to a controller (Teledyne ISCO, model 500D, Lincoln, Nebraska, USA), an stainless steel extractor vessel (1.95 cm of diameter and 19.4 cm of height) with a capacity of 58 cm³ and two thermostatic baths (Julabo, Model F25-ME, Seelbach, Baden-Württemberg, Germany) to cool the syringe pumps and the extraction vessel (Fisatom, model 806, São Paulo, São Paulo, Brazil). The high-pressure syringe pump (Bench Top, Dual Pump series) used in the extractions delivers the specified pressure, total volumetric flow rate, each solvent's percentual volumetric flow rate, and total volume reservoir conditions and can operate at either constant pressure or constant flow rate.

The extractor vessel has two 200-mesh wire filters (one at each end) and the vessel was loaded with ~10 g of hop residue for each extraction. The system was then heated and pressurized to the desired temperature and pressure. The static extraction was performed with the solvent maintained in contact with the hop residue for 20 minutes. During the dynamic extraction at a constant solvent flow rate, the hop extract in bottles previously weighed and protected from light (amber) with predetermined mass. For each extract, ~10 g of hop residue was used, and an extraction time of 60 minutes. The extraction conditions of temperature (°C), pressure (bar), and percentage of Ethanol were adjusted and changed for each extract according to Table 6 (Taguchi design). The extract yield and its compounds were evaluated to determine the best extraction condition. The yield was calculated from the extract's mass to the residue's initial weight.

5.2.3 Chromatographic characterization

The extracts were analyzed on a gas chromatograph (Agilent 7890B) coupled to a mass spectrometer (Agilent 5977A MSD), operating with an electron source with an ionization energy of 70 eV. An HP-5MS IU capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.250 mm) filled with a stationary phase of 5% phenyl and 95% dimethyl polysiloxane was used. The injected volume of samples, properly diluted, was 2 μ L, under the oven programming conditions: initial temperature of 50 °C being maintained for 3 min followed by heating at 3 °C/min until the final temperature of 300 °C, remaining for 10 min. Sample injection was performed in split mode at a 1:20 ratio with a constant flow of 1.0 mL/min of helium as a carrier gas, with the injector temperature maintained at 250 °C and the transfer line at 290 °C. In the mass detector, the ionization chamber temperature was 230 °C, and the quadrupole temperature was 150 °C. In the mass spectrometer, the EM detection system was used in "scan" mode, operating in the mass/charge ratio range (m/z) of 40 - 600, with a "solvent delay" of 3 min.

The compounds were identified by comparing their mass spectra with the mass spectra of the NIST 11.0 library and by comparing their retention indexes (RI) obtained by a homologous series of the n-alkane standard, C7 to C40. The concentrations were obtained by analyzing each chromatographic peak's relative area compared to the internal standard's peak area [21].

5.2.4 Antioxidant activity

To investigate the antioxidant potential of the hop cone residue extracts, five distinct *in vitro* techniques were employed: two cell-based methods (1) oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA) and (2) the inhibition of the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); in addition to three chemical assays (3) reduction of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH); (4) reduction of the 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) cation and (5) reduction power of the ferric ion (FRAP).

5.2.4.1 Oxidative Hemolysis Inhibition Assay (OxHLIA)

The analysis of the OxHLIA method was performed using an erythrocyte solution (2.8%, v/v; 200 μ L) prepared with a phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4), which was homogenized with 400 μ L of extract solution (2.03–130 μ g/mL in PBS) and Trolox (positive control; 7.81–125 μ). These mixtures were pre-incubated for 10 min at 37 °C with continuous

agitation. Then, 200 μL of 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH; 160 mM in PBS) was added, and the optical density was kinetically measured at 690 nm using an ELx800 microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) to hemolysis. The IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) for 60 min Δt were obtained by correlating the extract concentration to the Δt values (min), which resulted from half the hemolysis time (Ht_{50} values) obtained from the hemolytic curves of each concentration of extract minus the Ht_{50} value of the PBS control [22].

5.2.4.2 TBARS test

Analysis of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method provides a measure of the ability to inhibit oxidation that occurs in a pre-incubation phase. For this method, 200 μL of sample solution (extracts from each sample) were diluted, then mixed with 100 μL of FeSO_4 (10 μM) and 100 μL of ascorbic acid (0.1 mM) in an Eppendorf reaction tube (2mL). This mixture was pre-incubated for 1 h at 37 °C. Subsequently, the reaction mixture was completed with 500 μL of trichloroacetic acid (28% w/v) and 380 μL of thiobarbituric acid (TBA, 2% w/v). This resulting solution was heated for 20 min at 80 °C. Finally, the reaction tubes were centrifuged at 3000 $\times$ g for 10 min, and to quantify the malondialdehyde (MDA)-TBA complex, the absorbance of the supernatant was read at 532 nm. The results were expressed as IC_{50} values ($\mu\text{g/mL}$) [22].

5.2.4.3 DPPH radical scavenging activity assay

The analysis of antioxidant activity by the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) method followed the protocol described by Rufino et al. [23] and Ma et al. [24]. In tubes protected from light, 25 μL of the diluted extract (1 mg/mL) and 2 mL of the 6.25×10^5 mol/L DPPH solution were added and kept for 30 min. Subsequently, the reading was performed in a spectrophotometer (Agilent Cary 60 UV-Vis) at 517 nm. An analytical standard curve with Trolox solution [($\pm$)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-acid carboxylic] was constructed (100-2000 $\mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.9918$). The results were expressed in μmol Trolox/mg dry weight (DW).

5.2.4.4 ABTS radical scavenging activity assay

Antioxidant activity by the ABTS method (2,2'-azino-bis-(-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt, ~98%) was determined according to Rufino et al. [25]. In light-protected tubes, 30 μL of the extract (1 mg/mL) and 3 mL of the ABTS⁺ solution were placed in

the dark at room temperature for 6 min, and three measurements were taken for each sample and analyzed on average. The reading was performed in a spectrophotometer (Agilent Cary 60 UV-Vis) at 734 nm, and a standard curve with Trolox solution was constructed (50–2000 $\mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.9947$). Results were expressed in $\mu\text{mol Trolox/mg DW}$.

5.2.4.5 Reduction of iron (III) to iron (II) (FRAP)

The analysis of antioxidant activity using the FRAP iron reduction method started with the preparation of the FRAP reagent, adding 25 mL of acetate buffer (0.3 mol/L, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ solution (10 mmol/L [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-S – triazine]) and 2.5 mL of ferric chloride hexahydrate solution (FeCl_3 , 20 mmol/L). A mixture of 100 μL of the sample (1 mg/mL), 300 μL of distilled water, and 3 mL of FRAP reagent were added to test tubes protected from light, followed by homogenization, and kept in a water bath at 37 °C for 30 min. Then, the reading was performed in the spectrophotometer (Agilent Cary 60 UV-Vis) at 593 nm, and a standard curve with Trolox solution was constructed (100 to 700 $\mu\text{mol/L}$; $R^2 = 0.9954$). The results were expressed in $\mu\text{mol Trolox/mg DW}$. This assay was performed according to Rufino et al. [23] with modifications.

Hop extracts were diluted in methanol, 1 mg of extract in 1 mL of methanol. This diluted extract was stored in an amber bottle to protect against light and refrigerated until the analysis of the DPPH, ABTS, and FRAP assays.

5.2.5 Cytotoxic activity

The extracts obtained from the hop cone residue were suspended in water to obtain a stock solution of 8 mg/mL, diluted to obtain a range of five concentrations below the stock solution. The culture of non-tumor cells, called PLP₂, was created using a freshly harvested porcine liver obtained from a local slaughterhouse, according to a procedure established in preliminary tests. The sulforhodamine B assay was performed according to the previously described procedure [26]. Ellipticine was used as a positive control, and the results were expressed in GI50 values ($\mu\text{g/mL}$), corresponding to the sample concentration that provides 50% inhibition of cell growth.

5.2.6 Antimicrobial activity

The hop cone extracts were dissolved in water to obtain a stock solution of 20 mg/mL, and were serially diluted to obtain the concentration ranges of 20 to 0.15 mg/mL. Different microorganisms were used, namely five Gram-negative bacterial strains: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Morganella morganii* (ATCC 8076), *Proteus mirabilis* (ATCC 29906), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and three Gram-positive strain, namely *Enterococcus faecalis* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 25923). All microorganisms were purchased from Frilabo, Porto, Portugal. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the serial microdilution method and by the p-iodonitrotetrazolium violet (INT) rapid colorimetric assay, following the protocol described by Sokovic et al. [27] and Soković and van Griensven [28]. MICs were delimited as the lowest concentration of extract that inhibits visible microbial growth (under a binocular microscope). Minimum bactericidal concentrations (MBC) was the lowest extract concentration required to inactivate the original inoculum. Five percent DMSO was used as a negative control. As positive controls, Streptomycin and Ampicillin were used. Results were given as MICs and MBCs in mg/mL.

5.2.7 Statistical analysis

All analyzes were performed in triplicates, and the data were analyzed using the Design of the Experiment (Taguchi analysis). The data were analyzed using the Principal Component Analysis (PCA) with a matrix of 11 rows (11 extracts) and 22 columns (compounds, yield, and antioxidant activity). Hierarchical clustering analysis (HCA) was performed using the coordinates of the extracts in the first and second dimensions of the PCA map. Euclidean distances (dissimilarity), automatic truncation, and Ward's method (agglomeration method) were used. The dendrogram quality was evaluated using the cophenetic correlation coefficient. All statistical analyses were performed using XLSTAT 2022.2.1 (Adinsoft®, New York, USA).

5.3 Results and discussion

5.3.1 Extraction conditions and yield

The supercritical fluid extraction method proved to be a good process for the recovery of compounds from the residual cone of the brewery since the extracts presented remarkable yields

(superior to 11.00%, Table 6, except E1). Pressure had a positive impact on yield ($p = 0.03$). In this way, extracts E4 (24.70%), E7 (24.20%), and E3 (19.45%) showed the highest yield values among the 11 extracts. In common, they used higher pressure values (200 bar). Although temperature and solvent percentage had no significant impact ($p = 0.95$ and $p = 0.82$), E1 showed the lowest yield (7.17%), demonstrating that the mild conditions (40°C, 100 bar, 5% EtOH) resulted in lower extraction of compounds. However, the increased EtOH percentage for the same temperature and pressure conditions (E5) increased the yield. CO₂ is considered the leading agent for the extraction of compounds from the raw material, and ethanol as a co-solvent or higher pressure can increase the solubility of some solutes in CO₂, increasing the extraction rates and resulting in higher yields [20].

5.3.2 Chromatographic Analysis

The main compounds of the terpene and bitter acid class identified by gas chromatography were compiled in Table 7 with their respective relative areas. A total of 16 compounds were detected, including terpenes, sesquiterpenes, oxygenated sesquiterpenes, and bitter acid. Caryophyllene, caryophyllene oxide, and humulene were identified in all extracts. At the same time, lupulone was present in almost all samples (except for sample E7). Lupulone and humulene are well-known compounds in the hop and present pharmacological and biological properties, such as cancer chemopreventive, sedative, antioxidant, and antimicrobial activities [19].

The solvent percentage negatively impacted the contents of caryophyllene ($p = 0.04$) and caryophyllene oxide ($p = 0.02$), whereas temperature positively impacted the content of lupulone ($p = 0.05$). In this way, E1-E4 extracts showed a higher concentration of caryophyllene and caryophyllene oxide, with predominance in E4 and E1, respectively. These extracts were obtained using the lowest ethanol percentage (5%). At the same time, E2, E4, E6, and E8 showed greater concentrations of lupulone, with predominance in E4. These extracts were obtained using the highest temperature (60 °C). Increases in temperatures may result in higher vapor pressure of solutes, CO₂ diffusivity, and the solubility of some compounds in the CO₂, leading to higher concentrations in the extract [20].

Some compounds were identified only in specific extracts, demonstrating that interactions among variables are important for compound extraction. For example, E1 presented alpha-copaene and γ -elemene, whereas E5 presented nerolidyl acetate, linalyl isobutyrate, α -acorenol, and geranyl

isovalerate. These results suggest that mild pressure and temperature conditions helped maintain a higher concentration of these compounds in the extracts, as E1 and E5 were conducted at 40 °C and 100 bar. They also demonstrate the importance of EtOH as a co-solvent, with different compounds extracted depending on the concentration used.

5.3.3 Antioxidant activity

The *in vitro* antioxidant potential of the hop residue extracts was evaluated by a set of chemical assays, namely DPPH, FRAP, and ABTS methodologies, which are often used to estimate the antioxidant activity of plant extracts [29]. The variables (temperature, pressure, and ethanol percentage) had no significant impact on the antioxidant activity ($p > 0.05$). However, E5 extract (DPPH: 1048.22 ± 7.89 ; FRAP: 746.00 ± 4.64 and ABTS: 1095.67 ± 13.30 $\mu\text{mol Trolox mg/DW}$), E6 (DPPH: 1084.55 ± 9.05 ; FRAP: 602.62 ± 7.96 and ABTS: 1134.63 ± 12.19 $\mu\text{mol Trolox mg/DW}$), E9 (DPPH: 1238.15 ± 6.09 ; FRAP: 550.36 ± 0.99 and ABTS: 1338.11 ± 10.38 $\mu\text{mol Trolox mg/DW}$) and E10 (DPPH: 1104.89 ± 2.50 ; FRAP: 568.88 ± 10.10 and ABTS: 1285.15 ± 15.27 $\mu\text{mol Trolox mg/DW}$) exhibited better antioxidant activities for the three methodologies tested (Table 3). These results demonstrate that lower pressures concomitantly to medium or high ethanol percentages were important parameters to increase the antioxidant activity. In addition, the results of antioxidant activity corroborate those of chromatographic analysis.

It is important to highlight that the antioxidant potential here reported for chemical assays is higher than those reported by previous studies [1,19,30,31], which indicates that the hop residue extracts present a chemical complexity of compounds that are reactive to free radicals. In this way, the hop cone, normally discarded, is a promising source for significantly inhibiting free radicals.

Likewise, the antioxidant potentials verified using cell-based assays are described in Table 3, with results expressed as EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). The extract that showed the best antihemolytic action by the OxHLIA assay was E1, with a value of 37 ± 2 ($\mu\text{g/mL}$). Yet the other extracts that showed better activities were $\text{E3} > \text{E2} > \text{E6} > \text{E5} > \text{E4}$. The possible mechanism of this cell-related antioxidant activity can be explained by the capture of free radicals and alteration of some of the properties of the cell membrane by the action of some compounds. These can permeate the membrane bilayer and lead to a decrease in fluidity and stability. With the reduction of membrane permeability, the diffusion of free radicals through it is limited, thus hindering the cell lysis process,

and consequently, there is a cellular antioxidant potential [32]. And so far, this is the first result reported in the literature with this methodology to verify the biological potential of hop extracts.

The TBARS assay checks the ability of the extract to inhibit the formation of malondialdehyde and other end products of low molecular weight that are generated through *ex vivo* decomposition and lipid peroxidation. Porcine brain cells were used because they are biological substrates rich in polyunsaturated fatty acids and thus are good models for studying lipid peroxidation [33]. The extracts that showed the best EC₅₀ values for this test were E8 > E9 > E7 > E10 > E11 > E4.

5.3.4 Antimicrobial activity

The extracts showed inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, being more effective against Gram-negative strains (Table 4), meaning that these extracts contain compounds with antibacterial potential. According to the obtained results the extract's activity were as follows: E1 showed a MIC value of 5.0 mg/mL against *Proteus mirabilis*, E3 revealed a MIC of 10 mg/mL against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, E4 with a MIC of 10 mg/mL against *Enterococcus faecalis*, E6 with a MIC of 10 mg/mL against *Klebsiella pneumoniae*, E8 exhibiting a MIC of 5.0 mg/mL for *Proteus mirabilis*, and activity at 10 mg/mL against *Klebsiella pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*, E9 with a MIC of 10 mg/mL for *Enterococcus faecalis*, E10 with MIC of 10 mg/mL for *Proteus mirabilis* and *Enterococcus faecalis*, and E11 with a MIC of 10 mg/mL for *Proteus mirabilis*. Thus, the extracts showed that hop residue contains compounds with the antibacterial potential to control inhibit the tested pathogens that cause intestinal, urinary, pulmonary, and meningeal infectious diseases. In addition, the Gram-negative bacterial strain *Proteus mirabilis* was the most sensitive to the hop residue extracts (E1, E3, E8, E10, E11).

Antimicrobial activity is associated with lupulone and humulones in hop extracts. Such compounds have a hydrophobic characteristic, and the number and length of the side chains of these molecules increase their lipophilic character, allowing them to penetrate the bacterial cell wall more easily. Their interaction with the inner wall damages cell structures, inhibiting the active transport of sugars and amino acids and causing bacterial inhibition [6,34]. Differences in the type and concentrations of compounds found in the extracts can explain the different antimicrobial activity.

5.3.5 Cytotoxic activity

To verify the safety of the extracts obtained, they were subjected to analysis with primary pig liver cells (PLP₂) because it has a cellular and physiological similarity to the human organ [35]. As can be seen in Table 10, the 11 extracts notably showed no hepatotoxicity for PLP₂ cells up to the maximum tested concentration of GI₅₀ >400 µg/mL. Alonso-Esteban et al. [33] reported the same result for their extract of hop seed, stating that their extract does not cause liver cytotoxicity. Considering the above, one might consider that the extracts from the brewery residue are potentially safe for products intended for human consumption in the pharmaceutical and nutraceutical areas.

5.3.6 PCA map

The first three principal components (PC1, PC2, and PC3) explained 81.20% of the total variance of the data (PC1: 34.64%, PC2: 28.97%, PC3: 17.59%) (Figure 4). PC1 separated E1-E4 (on the right side) from the other runs (left side). In this way, E1-E4, but mainly E1, were characterized by a higher concentration of alpha-copaene, γ-muurolene, γ-elemene, α-muurolene, caryophyllene oxide, ledene oxide-(II), and cis-Z-α-bisabolene.

PC2 separated E1 and E5 (above the axis) from the other extracts (intermediate and below the axis). In this way, E1 and, mainly E5, showed a higher concentration of nerolidyl acetate, linalyl isobutyrate, α-acoreno, and geranyl isovalerate, with consequent higher antioxidant activity (FRAP, ABTS, and DPPH). However, these extracts showed lower yield and caryophyllene and humulene contents. Finally, PC3 separated E2-E5 (below the axis) from the other formulations (above the axis). This way, E2-E5, mainly E4 and E5, showed higher TBARS values.

The HCA of the data of yield, compounds, and antioxidant activity of the extracts (Figure 5) showed a cophenetic correlation of 0.881, indicating the stability of the groups and reliability of the dendrogram. Based on the dendrogram, there were 4 groups: the first group with the E1, the second group con E2-E4, E7, and E8, the third group with E5, and the fourth group with E6 and E9-E11. These results demonstrate that E1 and E5 had different compositions and biological activities than the other evaluated extracts.

In general, PCA and HCA results confirm that mild conditions (lower temperature and pressure and low or high ethanol concentrations) may result in extracts with a higher concentration

of compounds and more pronounced antioxidant potential in all assay. Therefore, the recommendation is to use the conditions of E1 or E5. However, these extracts may show a lower yield, mainly E1.

5.4 Conclusion

The obtained results demonstrate for the first time that the supercritical fluid extraction process had a good yield and is efficient for recovering compounds from hop cone residue. The extracts revealed potential antioxidant and antimicrobial activity and proved safety concerning hepatotoxicity screening assays. Thus, applying this by-product to the pharmacological, nutritional, and cosmetic sectors is feasible, in addition to helping to minimize the environmental impact and generate a more sustainable production chain. Lower temperatures (40 °C) and pressures (100 bar) and low or high ethanol percentages (5-10%) resulted in higher concentrations of compounds (alpha-copaene, γ -elemene, nerolidyl acetate, linalyl isobutyrate, α -acoreanol, geranyl isovalerate), and increased antioxidant potentials. It was observed that the percentage of ethanol as a co-solvent may influence the extract composition and, consequently, its biological activity.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Process no. 308505/2019-2) and Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) for financial support to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021), as well as the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the research support of the Cesumar Institute of Science, Technology and Innovation (ICETI), the Cesumar University (Unicesumar), Instituto Politécnico de Bragança (IPB) and State University of Maringa (UEM).

References

- [1] F.C. Önder, M. Ay, S.D. Sarker, Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS, *J Agric Food Chem.* 61 (2013) 10498–10506. <https://doi.org/10.1021/jf4031508>.
- [2] L. Bocquet, S. Sahpaz, N. Bonneau, C. Beaufay, S. Mahieux, J. Samaillie, V. Roumy, J. Jacquin, S. Bordage, T. Hennebelle, F. Chai, J. Quetin-Leclercq, C. Neut, C. Rivière, Phenolic compounds from humulus lupulus as natural antimicrobial products: New weapons in the fight against methicillin resistant staphylococcus aureus, leishmania mexicana and trypanosoma brucei strains, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>.
- [3] C.M. Liberatore, A. Calabuig-Serna, M. Rodolfi, B. Chiancone, J.M. Seguí-Simarro, Phenological phases of flowering in hop (*Humulus lupulus* L.) and their correspondence with microsporogenesis and microgametogenesis, *Sci Hortic.* 256 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108639>.
- [4] H. Korpelainen, M. Pietiläinen, Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential, *Econ Bot.* 75 (2021) 302–322. <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>.
- [5] D. Kowalczyk, M. Świeca, J. Cichocka, U. Gawlik-Dziki, The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets, *Journal of the Institute of Brewing.* 119 (2013) 103–110. <https://doi.org/10.1002/jib.73>.
- [6] L. Bocquet, S. Sahpaz, C. Rivière, An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop, in: 2018: pp. 31–54. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_2.
- [7] H. Jiang, S. Zhong, P. Schwarz, B. Chen, J. Rao, Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against *Fusarium graminearum*, *Food Chem.* 400 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134016>.
- [8] N.S. Tadei, N.C.C. Silva, C.H.T. Iwase, L.O. Rocha, *Fusarium* mycotoxins in beer production: Characteristics, toxicity, incidence, legislation, and control strategies, *Scientia Agropecuaria.* 11 (2020) 247–256. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.02.13>.

- [9] C. Dietz, D. Cook, M. Huismann, C. Wilson, R. Ford, The multisensory perception of hop essential oil: a review, *Journal of the Institute of Brewing*. 126 (2020) 320–342. <https://doi.org/10.1002/jib.622>.
- [10] M. Sterczyńska, M. Zdaniewicz, K. Wolny-Koładka, Rheological and microbiological characteristics of hops and hot trub particles formed during beer production, *Molecules*. 26 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030681>.
- [11] G. Vicente de Andrade Silva, G. Demaman Arend, A. Antonio Ferreira Zielinski, M. di Luccio, A. Ambrosi, Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review, *Food Chem.* 404 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134629>.
- [12] S.C. Kupski, E.J. Klein, E.A. da Silva, F. Palú, R. Guirardello, M.G.A. Vieira, Mathematical modeling of supercritical CO₂ extraction of hops (*Humulus lupulus* L.), *Journal of Supercritical Fluids*. 130 (2017) 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.011>.
- [13] F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - A review, *J Food Eng.* 95 (2009) 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>.
- [14] C. Schretter, J. Langeder, V. Freisinger, J.M. Rollinger, U. Grienke, Quantitative Analysis of Prenylated Constituents in Commercial Hops Samples Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography, *Planta Med.* 86 (2020) 1140–1147. <https://doi.org/10.1055/a-1130-0590>.
- [15] M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *J Chromatogr A*. 1217 (2010) 2495–2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>.
- [16] A. Formato, M. Gallo, D. Ianniello, D. Montesano, D. Naviglio, Supercritical fluid extraction of α - And β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid-liquid extraction, *Journal of Supercritical Fluids*. 84 (2013) 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.021>.
- [17] R. Vardanega, J.F. Osorio-Tobón, K. Duba, Contributions of supercritical fluid extraction to sustainable development goal 9 in South America: Industry, innovation, and infrastructure, *Journal of Supercritical Fluids*. 188 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105681>.

- [18] T.R. Arruda, P.F. Pinheiro, P.I. Silva, P.C. Bernardes, A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts, *LWT*. 141 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110905>.
- [19] J. il Lyu, J. Ryu, K.S. Seo, K.Y. Kang, S.H. Park, T.H. Ha, J.W. Ahn, S.Y. Kang, Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts, *Plants*. 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/plants11010135>.
- [20] B.A. Veiga, F. Hamerski, M.P. Clausen, M. Errico, A. de Paula Scheer, M.L. Corazza, Compressed fluids extraction methods, yields, antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content for Brazilian Mantiqueira hops, *Journal of Supercritical Fluids*. 170 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105155>.
- [21] S. Goren, I. Sabuncuoglu, Robustness and stability measures for scheduling: single-machine environment, *IIE Transactions*. 40 (2008) 66–83. <https://doi.org/10.1080/07408170701283198>.
- [22] S. Rodrigues, R.C. Calhelha, J.C.M. Barreira, M. Dueñas, A.M. Carvalho, R.M.V. Abreu, C. Santos-Buelga, I.C.F.R. Ferreira, *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS, *Food Research International*. 49 (2012) 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.046>.
- [23] M. Do, S.M. Rufino, R.E. Alves, E. Sousa De Brito, S. Maia De Moraes, C. de Goes Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F.D. Saura-Calixto, F.: Maria, S.M. Rufino, *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH Introdução*, (n.d.).
- [24] X. Ma, H. Wu, L. Liu, Q. Yao, S. Wang, R. Zhan, S. Xing, Y. Zhou, Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits, *Sci Hortic*. 129 (2011) 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.015>.
- [25] M. do S.M. Rufino, R.E. Alves, E.S. de Brito, S.M. de Moraes, C. de G. Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F.D. Saura-Calixto, *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)*, (n.d.).
- [26] F. Souilem, Â. Fernandes, R.C. Calhelha, J.C.M. Barreira, L. Barros, F. Skhiri, A. Martins, I.C.F.R. Ferreira, Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds:

- Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties, *Food Chem.* 230 (2017) 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.026>.
- [27] M. Soković, J. Glamočlija, P.D. Marin, D. Brkić, L.J.L.D. van Griensven, Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model, *Molecules*. 15 (2010) 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>.
- [28] M. Soković, L.J.L.D. van Griensven, Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*, *Eur J Plant Pathol.* 116 (2006) 211–224. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>.
- [29] Keskin, Y. Şirin, H.E. Çakir, M. Keskin, An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes, *South African Journal of Botany*. 120 (2019) 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.017>.
- [30] R. Censi, D.V. Peregrina, M.R. Gigliobianco, G. Lupidi, C. Angeloni, L. Pruccoli, A. Tarozzi, P. di Martino, New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations, *Cosmetics*. 8 (2021). <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040096>.
- [31] L. Lela, M. Ponticelli, C. Caddeo, A. Vassallo, A. Ostuni, C. Sinisgalli, I. Faraone, V. Santoro, N. de Tommasi, L. Milella, Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract, *Food Chem.* 393 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133401>.
- [32] Y. Chen, P. Deuster, Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane, *Chem Biol Interact.* 182 (2009) 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.007>.
- [33] C. Alonso, C. Barba, L. Rubio, S. Scott, A. Kilimnik, L. Coderch, J. Notario, J.L. Parra, An ex vivo methodology to assess the lipid peroxidation in stratum corneum, *J Photochem Photobiol B.* 97 (2009) 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.08.003>.
- [34] Z. Kolenc, T. Langerholc, G. Hostnik, M. Ocvirk, S. Štumpf, M. Pintarič, I.J. Košir, A. Čerenak, A. Garmut, U. Bren, Antimicrobial Properties of Different Hop (*Humulus lupulus*) Genotypes, *Plants*. 12 (2023). <https://doi.org/10.3390/plants12010120>.
- [35] R.C.G. Corrêa, A.H.P. de Souza, R.C. Calhelha, L. Barros, J. Glamoclija, M. Sokovic, R.M. Peralta, A. Bracht, I.C.F.R. Ferreira, Bioactive formulations prepared from fruiting bodies

and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatus* Singer, Food Funct. 6 (2015) 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/C5FO00465A>.

Table 6. Extraction conditions and extract yield

Run	Temperature (°C)	Pressure (bar)	% solvent (ethanol)	Yield %
E1	40	100	5	7.17
E2	60	100	5	13.35
E3	40	200	5	19.45
E4	60	200	5	24.7
E5	40	100	10	13.32
E6	60	100	10	12.04
E7	40	200	10	24.20
E8	60	200	10	14.22
E9	50	150	7.5	16.41
E10	50	150	7.5	11.86
E11	50	150	7.5	19.22

Table 7. Compounds of the terpene and bitter acid class identified by GC-MS.

[illegible]

9	Trans-Z- α -Bisabolene epoxide	0.187 %	0.956 %	-	1.740	-	0.687	-	-	-	-	-	S.H.
10	Cis-Z- α -Bisabolene epoxide	0.073 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.147	S.H.
11	Lupulon	*26.47 5% (0.354; 13.064 ; 6.859; 1.024; 3.384; 1.057; 0.733)	*22.75 6% (14.02 9; 8.727)	*20.50 9% (11.64 7; 8.862)	*30.504 % (18.364; 12.140)	*17.23 7% (9.256; 7.981)	*29.59 8% (14.90 2; 14.696)	-	*23.12 8% (11.44 4; 11.236 ; 0.448)	*18.1 62% (9.27 5; 8.887)	*17.30 6% (7.802; 6.686; 2.818)	*15.43 % (9.440; 5.990)	B.A.
12	Cis-muurola-3,5-diene	-	0.286 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S.H.
13	Nerolidyl acetate	-	-	-	-	0.095	-	-	-	-	-	-	S.H.
14	Linalyl isobutyrate	-	-	-	-	0.069	-	-	-	-	-	-	S.H.
15	α -acorenol	-	-	-	-	0.236	-	-	-	-	-	-	S.H.
16	Geranyl isovalerate	-	-	-	-	0.044	-	-	-	-	-	-	S.H.

*Summed relative áreas.

**S.H. Sesquiterpene Hydrocarbon; O.S. Oxygenated Sesquiterpene; B.A. Bitter Acid.

Table 8. *In vitro* antioxidant potential of the hop cone residue extracts.

Extract	<i>Cell-based assays</i>				<i>Chemical assays</i>		
	OxHLIA EC ₅₀ (µg/mL)	Positive control	TBARS EC ₅₀ (mg/mL)	Positive control Trolox (TE)	DPPH (µmol ET Trolox mg/DW)	FRAP (µmol ET Trolox mg/DW)	ABTS (µmol ET Trolox mg/DW)
	Δt = 60 min	Trolox (TE)					
E1	37±2	21.8±0.2	2.59±0.4	5.8±0.6	658.89 ± 9.05	482.87 ± 4.59	997.22 ± 16.36
E2	97±6	21.8±0.2	6.10±3.85	5.8±0.6	572.78 ± 3.34	405.33 ± 3.38	815.17 ± 16.5
E3	55±3	21.8±0.2	2.1±0.6	5.8±0.6	524.44 ± 5.93	440.83 ± 2.00	824.70 ± 19.41
E4	190±10	21.8±0.2	1.71±0.10	5.8±0.6	259.44 ± 6.54	438.95 ± 3.05	633.83 ± 19.37
E5	142±6	21.8±0.2	10.8±3.0	5.8±0.6	1048.22 ± 7.89	746.00 ± 4.64	1095.67 ± 13.30
E6	111±8	21.8±0.2	2.0±0.5	5.8±0.6	1084.55 ± 9.05	602.62 ± 7.96	1134.63 ± 12.19
E7	304±10	21.8±0.2	0.45±0.02	5.8±0.6	330.55 ± 6.77	496.00 ± 5.41	747.52 ± 7.81
E8	273±22	21.8±0.2	0.3±0.06	5.8±0.6	903.89 ± 2.69	575.37 ± 6.13	1072.56 ± 17.82
E9	377±11	21.8±0.2	0.35±0.06	5.8±0.6	1238.15 ± 6.09	550.36 ± 0.99	1338.11 ± 10.38
E10	360±14	21.8±0.2	0.5±0.16	5.8±0.6	1104.89 ± 2.50	568.88 ± 10.10	1285.15 ± 15.27
E11	253±9	21.8±0.2	0.89±0.05	5.8±0.6	736.67 ± 8.66	504.95 ± 5.73	894.93 ± 10.28

Table 9. Antibacterial potential of the hop cone residue extracts.

Extracts	Gram negative bacteria								Gram positive bacteria							
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Morganella morganii</i>		<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		MRSA	
	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB
E1	>10	>10	>10	>10	>10	>10	5	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E2	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E3	10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E4	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10
E5	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E6	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E7	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
E8	>10	>10	10	>10	>10	>10	5	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10
E9	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10
E10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10
E11	>10	>10	>10	>10	>10	>10	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Positive Control																
Streptomycin	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB
	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	0.5	1	n.t.	n.t.	<0.0078	<0.0078	n.t.	n.t.
Ampicillin	<0.15	<0.15	10	10	>10	>10	<0.15	<0.15	>10	>10	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15

MIC – minimum inhibitory concentration; MCB – minimum bactericidal concentrations; n.t. – not tested; MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Table 10. Hepatotoxicity (GI_{50} , $\mu\text{g/mL}$) in non-tumor cells (PLP2).

Extract	PLP2 $\mu\text{g/mL}$	Positive control Ellipticin $\mu\text{g/mL}$
E1	>400	1.4 ± 0.1
E2	>400	1.4 ± 0.1
E3	>400	1.4 ± 0.1
E4	>400	1.4 ± 0.1
E5	>400	1.4 ± 0.1
E6	>400	1.4 ± 0.1
E7	>400	1.4 ± 0.1
E8	>400	1.4 ± 0.1
E9	>400	1.4 ± 0.1
E10	>400	1.4 ± 0.1
E11	>400	1.4 ± 0.1

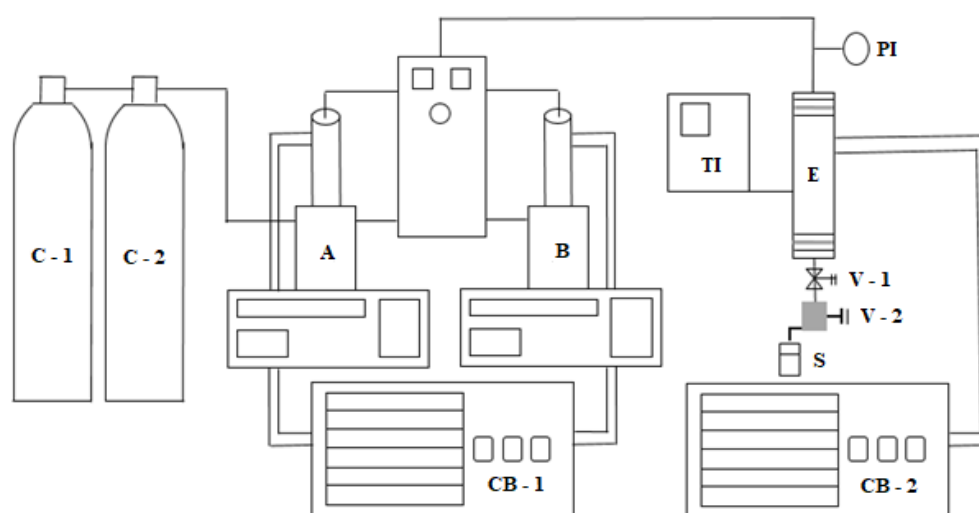


Figure 3. Schematic diagram of the extraction equipment: C-1 carbon dioxide cylinder; C-2 ethanol vessel; CB-1 and CB-2 circulation baths; A carbon dioxide syringe pump; B ethanol syringe pump; PI pressure indicator; TI temperature indicator; E extractor; V-1 need.

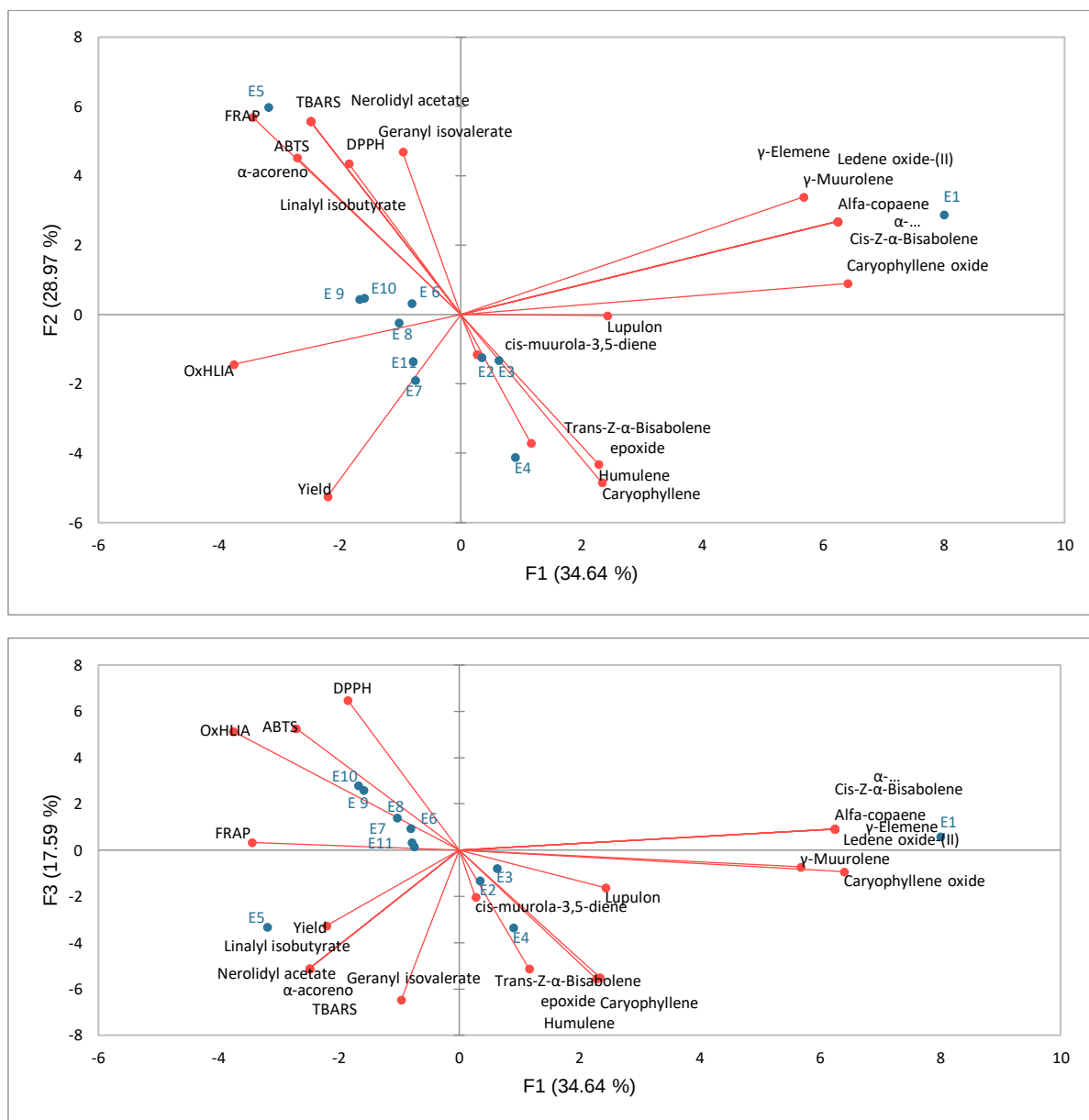


Figure 4. PCA of the compounds, yield, and antioxidant activity.

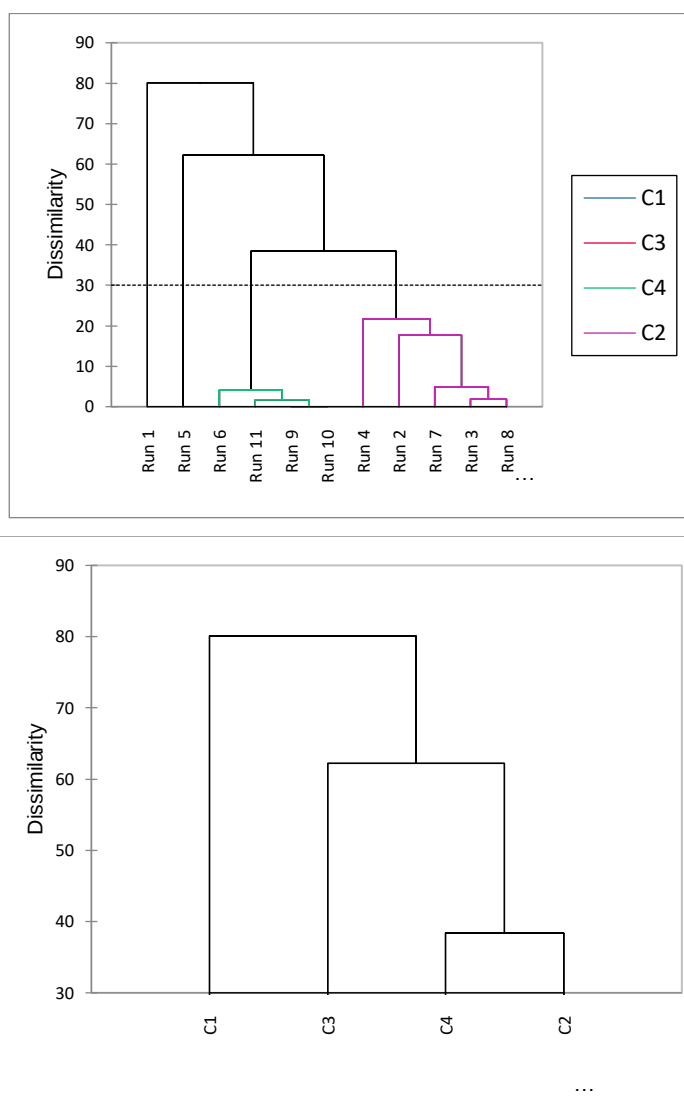


Figure 5. HCA of the compounds, yield, and antioxidant activity.

NORMAS DA REVISTA

Journal of CO₂ Utilization

The Journal of CO₂ Utilization offers a single, multi-disciplinary, scholarly platform for the exchange of novel research in the field of CO₂ re-use for scientists and engineers in chemicals, fuels and materials.

The emphasis is on the dissemination of leading-edge research from basic science to the development of new processes, technologies and applications. This includes CO₂ as a feedstock in the chemical, energy and materials sectors, and utilization in general to help minimize environmental impact.

The Journal of CO₂ Utilization publishes original peer-reviewed research papers, reviews, and short communications, including experimental and theoretical work, and analytical models and simulations.

The coverage includes, but is not limited to: Materials for CO₂ activation and adsorption Heterogeneous and homogeneous catalytic reactions involving CO₂ CO₂ conversion to generate synthetic fuels, polymers, organic carbonates, and intermediate products. Supercritical CO₂ utilization in natural product extraction, catalysis and separation Use of CO₂ as an oxidant Electrochemical and photo-electrochemical conversion of CO₂ Photo-electrochemical, photo-thermal and photochemical conversion of CO₂ Biological conversion of CO₂ Integrated processes for CO₂ conversion and reduction.

This journal welcomes contributions that support and advance the UN's sustainable development goals, in particular SDG 7 (Affordable and clean energy) and SDG 13 (Climate Action).

IMPACT FACTOR

8.321 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

CITE SCORE

11.3

Types of article

The Journal of CO₂ Utilization publishes original peer-reviewed research papers, reviews, and short communications.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Article structure Subdivision

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Data Availability

Authors are encouraged to include a 'Data Availability' section in their manuscript which is visible in ALL reading formats and may refer to data hosted in ANY repository. It should be placed before the references to provide readers with information about where they can obtain the research data required to reproduce the work reported in the manuscript, and typically consists of a simple sentence giving the URL(s) of and citation(s) to the dataset(s). Full information can be found [here](#).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos reportados na literatura, o lúpulo está se destacando por conta de novas evidências de suas propriedades bioativas como a sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica, dentre outras. Além disso, os biorresíduos da cadeia produtiva agrícola (folha e caule) demonstraram diversos potenciais de aplicações biotecnológicas com a capacidade de promover um reaproveitamento das mesmas para produção de produtos dermocosméticos e nutricionais. Ainda, os resíduos agroindustriais do setor cervejeiro, foram apontados como matrizes sustentáveis de compostos bioativos, com potencial de reaproveitamento para geração de novos produtos e até mesmo ser utilizada como matéria-prima por outros setores industriais.

O processo extrativo com a metodologia do Fluido Supercrítico no cone do lúpulo residual demonstrou de forma pioneira, que este método é eficiente para recuperar compostos bioativos e obteve bons valores de rendimentos. Os extratos mostraram potencial atividade antioxidante e antimicrobiana e provaram ser seguros em ensaios preliminares de hepatotoxicidade. Ainda, observou-se que o uso do cossolvente etanólico pode influenciar na composição química do extrato e, conseqüentemente nas atividades biológicas. Desse modo, o biorresíduo mostrou ser viável para a aplicação em setores farmacológico, nutricional e cosmético. Além disso, esse reaproveitamento por meio de aplicações biotecnológicas poderia ajudar a minimizar o impacto ambiental e gerar uma cadeia produtiva mais sustentável.