



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**



**Uso de terpenos como solventes verdes para substituição de éter-dietílico e metanol no preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo**

**Graduanda: Lais Gomes Sanchez**

**Orientador: Prof. Dr Stanislaw Bogusz Junior**

**São Carlos, 2023**

LAIS GOMES SANCHEZ

**Uso de terpenos como solventes verdes para substituição de éter-dietílico e metanol  
no preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo**

Monografia apresentada ao Instituto de Química de  
São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo  
(USP) como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Bacharel em Química com Habilitação  
Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

São Carlos - SP

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da vida e de construir caminhos como este, agradeço também imensamente aos meus pais, aos meus amigos e ao meu companheiro pelos conselhos dados e por todo o apoio de sempre, vocês foram essenciais para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa em minha vida.

Agradeço a Universidade de São Paulo e, em especial, a todos os professores do Instituto de Química de São Carlos pela imensa contribuição em minha formação profissional e, ao Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior, por ter me orientado neste trabalho de conclusão de curso e por todos os ensinamentos em química analítica.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por todo o auxílio e apoio durante a realização desta pesquisa.

## EPÍGRAFE

"Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido."

Marie Curie

## **RESUMO**

Nesta monografia de conclusão de curso foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o histórico das discussões sobre problemas ambientais no mundo e sua relação com a química verde e, em seguida, realizou-se uma prova de conceito, sobre a possibilidade de se miniaturizar o volume de solvente no preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo, bem como se investigou a possibilidade de se utilizar terpenos no lugar do tolueno como solvente extrator. Dos terpenos testados, isto é, limoneno, eugenol e farnezol, o eugenol foi aquele capaz de solubilizar e extrair os analitos de interesse de maneira mais adequada. E, embora não tenha havido tempo para determinações quantitativas com uso de eugenol como solvente extrator, os resultados preliminares aqui obtidos se revelaram promissores, sugerindo a continuidade deste estudo, com a adequada validação do método analítico e comparação de resultados quantitativos com o método oficial de análise.

Palavras chave: química verde, humulonas e lupulonas, terpenos, cromatografia líquida de alta eficiência.

## **ABSTRACT**

In this research, we present a review on the historical discussions of environmental issues and their connection to green chemistry and green analytical chemistry. Subsequently, a proof of concept was carried out to explore the possibility of minimizing the volume of solvent in the preparation of samples for the analysis of humulones and lupulones in hops. Additionally, the potential use of terpenes as an alternative to toluene as extracting solvent was investigated. Among the tested terpenes, namely limonene, eugenol, and farnesol, just eugenol proved to be the most suitable for solubilizing and extracting the target analytes. These preliminary results are very promising, and suggest further studies, including the proper validation of the analytical method and the comparison of quantitative results with the official analysis method.

Keywords: green chemistry, humulones and lupulones, terpenes, high-performance liquid chromatography.

## Sumário

1. Introdução .....	8
1.1 Breve contextualização histórica .....	8
1.2 Um pouco de química verde .....	9
1.3 Um pouco de química analítica verde .....	12
1.4 A importância do conceito de sustentabilidade .....	14
1.5 Porque este trabalho de pesquisa foi realizado .....	15
1.6 O lúpulo e os analitos alvo deste estudo .....	16
2. Objetivos .....	17
2.1 Objetivo Geral .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3. Materiais e Métodos .....	18
3.1 Amostras de lúpulo .....	18
3.2 Materiais, reagentes e padrões .....	18
3.3 Determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo .....	18
3.4 Medida da polaridade dos solventes .....	19
3.5 Testes de solubilidade das humulonas e lupulonas nos terpenos .....	19
3.3.4 Extração de humulonas e lupulonas de Lúpulo com eugenol .....	20
4. Resultados e Discussão .....	20
4.1 Teores de humulonas e lupulonas nas amostras pelo método oficial .....	20
4.2 Medida da polaridade dos solventes .....	21
4.3 Testes de solubilidade das humulonas e lupulonas nos terpenos .....	23
4.4 Teste de extração de humulonas e lupulonas de lúpulo com eugenol .....	25
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	26
6. Referências Bibliográficas .....	27

## 1. Introdução

### 1.1 Breve contextualização histórica

O crescente processo de industrialização no século XX (1901 a 2000) representou um marco importante para o desenvolvimento econômico global (Marco, et al. 2019) e, apesar dos importantes avanços da industrialização para a melhoria da qualidade de vida das pessoas, este crescimento da indústria acabou por gerar impactos negativos no meio ambiente (Tobiszewski, et al. 2009). Em função disso, a partir dos anos 1940, os movimentos sociais passaram a lutar por um crescimento industrial que levasse em conta também os impactos da industrialização para o meio ambiente, o que provocou alterações significativas nas questões industriais (Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik, 2013). Essa evolução na forma de encarar o desenvolvimento industrial e os seus impactos no meio ambiente trouxe avanços notáveis na conscientização das pessoas e das empresas ao longo das últimas décadas. Na Figura 1 pode ser visualizada uma linha do tempo que ilustra as principais discussões relacionadas a química verde.

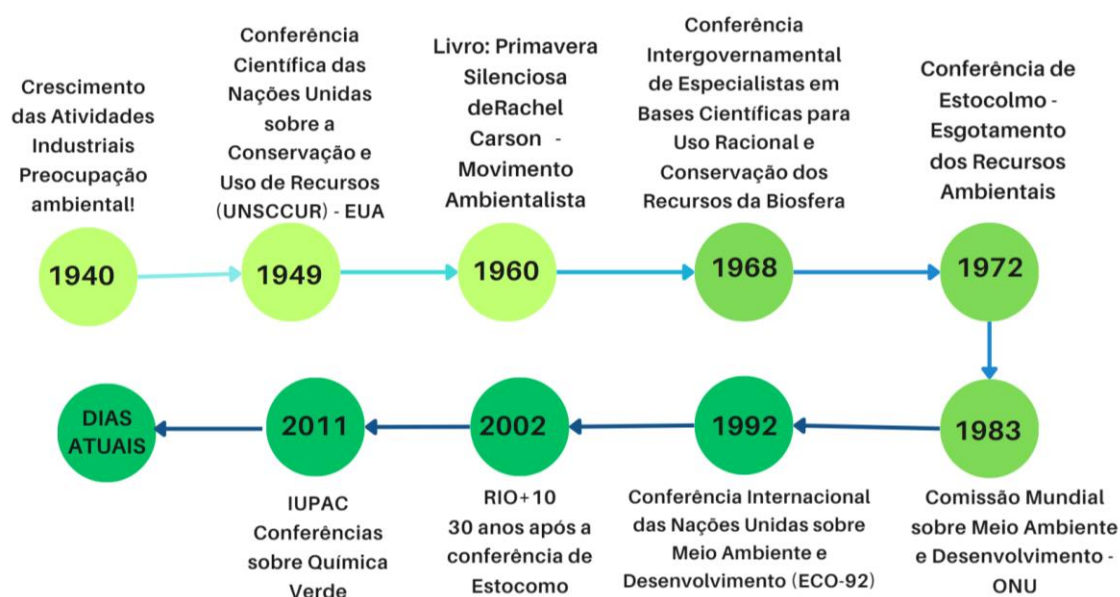


Figura 1. Histórico das discussões sobre problemas ambientais no mundo e sua relação com a química verde. Fonte: autoria própria.

De forma resumida, as primeiras preocupações ambientais surgiram oficialmente em 1949, durante a Conferência Científica das Nações Unidas sobre a Conservação e Uso de Recursos (UNSCCURI), que ocorreu nos Estados Unidos (Farias & Fávaro, 2011). Posteriormente, na década de 1960, surgiu o movimento



ambiental contemporâneo, impulsionado pela publicação do livro *Primavera Silenciosa* de Rachel Carson (Lutts, 1985). Então, apenas oito anos mais tarde (em 1968), durante a Conferência Intergovernamental de Especialistas sobre as Bases Científicas para o Uso Racional e Conservação dos Recursos da Biosfera (Conferência da Biosfera) é que as questões ambientais ganharam um destaque especial e uma maior repercussão (Farias & Fávaro, 2011). Posteriormente, ocorreu também a Conferência de Estocolmo de 1972, na qual se alertou sobre os danos ambientais da depleção dos ecossistemas. O que culminou, na década de 1980, no surgimento de diversas conferências mundiais sobre o meio ambiente, que resultaram no "Relatório Brundtland" de 1987. Este importante relatório definiu o conceito de desenvolvimento sustentável como: "o desenvolvimento que atende às necessidades da geração atual sem comprometer as necessidades das gerações futuras" (Marco, et al. 2019). Além disso, o relatório também enfatizou sobre os perigos da destruição da camada de ozônio e sobre os efeitos do aquecimento global, afirmando que a capacidade dos cientistas avaliarem e proporem soluções para estes problemas era muito inferior à velocidade do avanço das mudanças climáticas. Já em 1991, nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) lançou o programa de "Rotas Sintéticas Alternativas para a Prevenção da Poluição", marcando o início oficial da química verde em 1992 (Woodhouse & Breyman, 2005). Um ano após, ocorreu a Conferência ECO-92 que resultou na "Agenda 21", comprometendo os países com o desenvolvimento sustentável. Posteriormente, ocorreu a terceira grande conferência das nações unidas sobre meio ambiente, mais conhecida como conferência de Joanesburgo ou Rio+10 na qual participaram importantes líderes governamentais que reavaliaram as metas globais de preservação ambiental da Agenda 21 (Lago, 2007). Finalmente, tivemos o 43º Congresso Mundial de Química, o IUPAC 2011, cujo tema principal abordou a inovação entre as Américas e o mundo, buscando aproximar os países em busca de algo em comum: a sustentabilidade em suas ações (Goulart & Zuin, 2011).

## **1.2 Um pouco de química verde**

Como foi mencionado anteriormente, a química verde surgiu oficialmente, na década de 1990, quando os pesquisadores Paul Anastas e John Warner introduziram os 12 princípios da química verde (Anastas & Warner, 1998). Esses princípios (Tabela

1), que ainda se encontram em uso nos dias atuais, fundamentam-se, entre outros aspectos, na minimização ou na substituição dos solventes clássicos em processos industriais objetivando assim a minimização dos resíduos gerados nesses processos (Anastas, 1999).

Tabela 1. Os 12 princípios de química verde propostos por Anastas & Warner.

Número	Princípio	Descrição do Princípio
1	Prevenção	Este princípio diz respeito à prevenção da geração de resíduos, considerando que é melhor evitar a sua geração do que tratá-los.
2	Economia Atômica	Os processos de síntese química devem ser planejados de forma que o produto final incorpore o máximo possível dos reagentes utilizados durante o processo para, dessa forma, minimizar a geração de resíduos.
3	Sínteses Químicas mais seguras	Os processos de síntese química devem ser projetados para utilizar e gerar substâncias com baixa ou nenhuma toxicidade ocupacional e ambiental. Assim, a substituição de solventes tóxicos por solventes de baixa ou nenhuma toxicidade é altamente recomendada.
4	Design seguro de produtos químicos	Deve-se atribuir grande importância à toxicidade na etapa de design de produtos químicos. Eles devem, evidentemente, cumprir suas funções, mas também apresentar a menor toxicidade possível.
5	Solventes mais seguros	O uso de solventes e outros reagentes deve ser evitado sempre que possível. Quando isso não for possível, estas substâncias devem ser inócuas.
7	Uso de matérias-primas renováveis	Sempre que for econômica e tecnicamente viável, matérias-primas renováveis devem ser utilizadas no lugar daquelas não renováveis.
8	Redução de derivados	Processos de derivatização desnecessários devem ser sempre evitados ou minimizados, uma vez que seu emprego exige o uso adicional de reagentes e, portanto, gera mais resíduos.
9	Catálise	A utilização de reagentes catalíticos (o mais seletivos possível) é preferível à utilização de reagentes estequiométricos.
10	Produtos de degradação	Os produtos químicos devem ser projetados de modo que, ao final de sua função, se decomponham em produtos de degradação inofensivos e que não persistam no ambiente.
11	Análise em tempo real para prevenção da poluição	Procedimentos analíticos devem ser monitorados em tempo real para evitar a formação de substâncias perigosas.
12	Prevenção de Acidentes	Tanto as substâncias químicas quanto a maneira como elas são utilizadas em um processo químico devem ser escolhidas considerando a minimização de potenciais acidentes, tais como vazamentos, explosões e incêndios, visando assim uma maior segurança ocupacional e ambiental.

Fonte: Adaptado de Anastas & Warner, 1998.

Desta forma, conceitos de economia atômica e de energia passaram a ter um papel de destaque nos processos químicos, assim como o uso de matérias-primas

renováveis. Associado a isso, o controle da velocidade das reações químicas por meio de processos de catálise também permitiu obter uma maior economia de energia nos processos de síntese. Da mesma forma, o conceito de 'design de produtos e processos químicos' permitiu reduzir a toxicidade ocupacional e ambiental, de modo que os processos utilizados e os produtos gerados fossem menos agressivos para o meio ambiente, evitando fenômenos de bioacumulação e biomagnificação de toxicantes nos níveis tróficos (Anastas, 1999).

Em relação ao uso de solventes e reagentes mais seguros é importante lembrar que a maioria dos solventes orgânicos clássicos é altamente volátil, o que pode facilmente levar a poluição do ar e a contaminação ocupacional. Além disso, muitos destes solventes são também inflamáveis e explosivos constituindo uma fonte de risco de acidentes. Assim, segundo os princípios da química verde, sempre que possível, os solventes orgânicos clássico devem ser substituídos por água, etanol, CO<sub>2</sub> supercrítico ou até mesmo líquidos iônicos (Marco, et al. 2019). Na Figura 2, é apresentada uma classificação quanto a toxicidade de solventes baseada nos 12 princípios da química verde (Prat, Hayler, Wells, 2014).

RECOMENDADO	RECOMENDADO OU PROBLEMÁTICO?	PROBLEMÁTICO	PROBLEMÁTICO OU PERIGOSO?	PERIGOSO	MUITO PERIGOSO
Água Etanol Ácool Isopropílico N-butanol Acetato de Etil Acetato de Isopropil Acetato de Butil Anisol Sulfonil	Metanol Ter-Butanol Álcool Benzílico Etileno Glicol Acetona Butanona Metil-Isobutil cetona Ciclohexanona Metil-Acetato Ácido Acético Anidrido Acético	2-Metilte-trahidrofurano Heptano Metil-Ciclohexano Tolueno Xileno Clorobenzeno Acetonitrila Dimetil-propileno Ureia Dimetil - Sulfóxido	Metil terc-butil éter Tetra-hidrofurano Ciclohexano Diclorometano Ácido Fórmico Piridina	Di-isopropil éter 1,4-Dioxano Dimetiletoxietano Pentano Hexano N´N dimetil-formamida N´N dimetil-acetamida Metilpirrolidona Metoxi etanol Trietalonamina	Dietil-éter Benzeno Clorofórmio Tetracloroeto de Carbono Dicloroetano Nitrometano

- tóxico



+ tóxico



Figura 2. Classificação de solventes quanto a sua toxicidade. Adaptado de Prat, Hayler, Wells, 2014.

Ademais, vale a pena destacar que a adoção dos 12 princípios da química verde por uma indústria também conduz a benefícios econômicos nos processos

químicos. O que pode ser verificado pela menor necessidade de investimentos financeiros em etapas de armazenamento e tratamento de efluentes, bem como na possibilidade de se evitar o pagamento de indenizações por danos ambientais (Prado, 2003). Este é um aspecto muito importante pois, se a química verde não trazer benefícios econômicos para o mercado, ela não despertará interesse no seu emprego, nem será viável para ser adotada pelas empresas. Para ilustrar, este aspecto podemos mencionar o desastre ambiental ocorrido no Brasil em 2015, após o colapso da barragem de rejeitos da empresa de mineração Samarco, na cidade de Mariana, estado de Minas Gerais. Nessa tragédia, de acordo com a revista brasileira Exame (2017), mais de 34 milhões de metros cúbicos de lama fluíram pelo Rio Doce causando um enorme prejuízo em uma área estimada em seiscentos quilômetros quadrados, afetando o abastecimento de água e ameaçando os meios de subsistência de moradores da região. Após esse episódio, a empresa concordou com o governo brasileiro em realizar um trabalho de recuperação socioeconômica e ambiental no valor de 20 bilhões de reais (Exame, 2017). Estes custos poderiam ter sido evitados se os 12 princípios da química verde tivessem sido adotados e seguidos à risca pela empresa Samarco.

### **1.3 Um pouco de química analítica verde**

Podemos afirmar que, nos primórdios da química verde, predominava o tema da síntese orgânica verde em diferentes ramos da indústria química e, em especial, na indústria farmacêutica (Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik, 2013). Posteriormente, nos anos 2000, o Professor Jacek Namieśnik e colaboradores, introduziram a terminologia 'química analítica verde', baseando-se nos 12 princípios da química verde (Namieśnik, 2000). A partir de então, a química analítica verde consolidou-se como uma proposta relacionada principalmente ao papel dos químicos analíticos em tornar as práticas laboratoriais mais ecológicas e ambientalmente amigáveis através da substituição de reagentes tóxicos, da miniaturização e da automatização de métodos analíticos, permitindo assim reduzir drasticamente as quantidades de reagentes consumidos e de resíduos gerados para, desta forma, reduzir ou evitar os efeitos dos procedimentos analíticos no meio ambiente (Armenta, et al., 2008).

Tabela 2. Os 12 princípios da química analítica verde, propostos Namiński.

Número	Princípio e descrição
1	Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar a etapa de tratamento da amostra.
2	O tamanho e a quantidade de amostras devem ser os menores possíveis.
3	Análises <i>in situ</i> devem ser realizadas.
4	A integração de processos e operações analíticas deve ser realizada, pois promove economia de energia e reduz o uso de reagentes.
5	Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados.
6	Derivatizações devem ser evitadas, pois exigem o uso de reagentes adicionais e, portanto, geram resíduos.
7	A geração de grandes volumes de resíduos deve ser evitada, e o manuseio correto desses resíduos deve ser proporcionado.
8	Métodos multi-analíticos devem ser preferidos em relação a métodos que analisam um analito de cada vez.
9	O uso de energia elétrica deve ser minimizado.
10	Reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos.
11	Reagentes perigosos devem ser descartados.
12	A segurança dos operadores deve ser aumentada.

Fonte: adaptado de (Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik, 2013).

Sob a ótica da química analítica verde a maioria dos métodos analíticos não pode ser considerada verde e precisa de melhorias específicas, como a eliminação de reagentes tóxicos, a redução do uso de reagentes e de energia, e o aumento da segurança do analista. Mudanças são necessárias em todo o processo analítico, desde a amostragem até o tratamento dos resíduos. Essas mudanças podem ser feitas com a ajuda de diferentes estratégias, incluindo o uso de quimiometria e estatísticas para a redução do número de amostras; pelo uso de sistemas analíticos integrados para melhorar a eficiência analítica; pela redução do uso de reagentes; através da aplicação de reagentes menos tóxicos e, preferencialmente, naturais; e pela miniaturização de métodos visando a diminuição do risco para o operador bem como para o meio ambiente (Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik, 2013). A expectativa da adoção dos 12 princípios da química analítica verde em um laboratório é que estes fornecerão as diretrizes para tornar os laboratórios analíticos mais sustentáveis.

Além disso, segundo Kogawa, et al., (2016), de uma maneira bastante simplificada, a escolha correta de um método analítico, dos reagentes, dos acessórios, da qualificação do pessoal, do tempo de análise e da qualidade de um procedimento analítico, quando guiado pelos 12 princípios da química analítica verde

fazem parte do ‘pentagrama do pensamento ecologicamente correto’, conforme ilustrado na Figura 3.

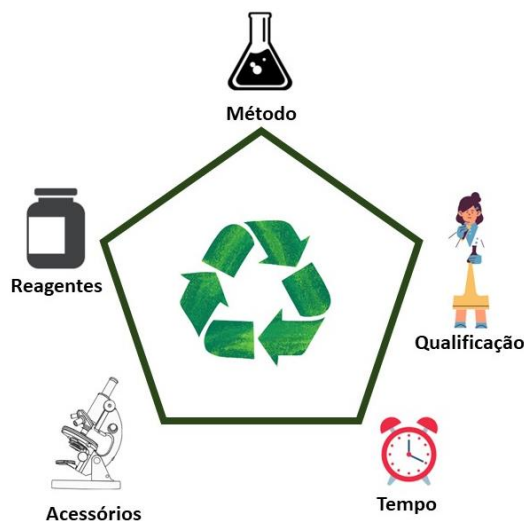


Figura 3. Pentagrama do pensar ecologicamente correto. Fonte: adaptado de Kogawa, et al., (2016).

#### 1.4 A importância do conceito de sustentabilidade

A química verde e a química analítica verde, como anteriormente mencionado, apresentam propostas para se trabalhar os problemas relacionados aos avanços da industrialização e suas consequências negativas para o meio ambiente. Neste sentido, é importante lembrar dos dezessete objetivos para o desenvolvimento sustentável (ODS) da agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU, 2023), que no seu objetivo de número doze contempla o consumo e a produção responsáveis. E que, nas metas deste mesmo objetivo, destaca a necessidade de, até 2030, reduzir substancialmente a geração de resíduos por meio da prevenção, redução, reciclagem e reuso. Bem como, alcançar o manejo ambientalmente adequado dos produtos químicos e de todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes para assim reduzir significativamente sua liberação para o ar, água e solo, a fim de minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente (ONU, 2023). A Figura 4 ilustra esses objetivos, organizados em nichos do que foi pensado como meta alcançável para o desenvolvimento do mundo.



Figura 4. Os 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) estabelecidos pela ONU. Fonte: (ONU, 2023).

Sendo assim, fica clara a importância dos princípios da química verde e a química analítica verde para que possam ser alcançadas as metas e os objetivos do ODS número 12 da agenda 2030 da ONU.

### 1.5 Porque este trabalho de pesquisa foi realizado

Baseado no exposto, este trabalho de pesquisa foi realizado para tratar de um problema real, como será explicado a seguir. As metodologias oficiais para análises químicas de humulonas e lupulonas em lúpulo (um ingrediente da fabricação de cerveja), utilizam um preparo de amostras baseado em extração sólido-líquido, com uso de solventes orgânicos como éter dietílico, metanol ou tolueno. E, o emprego de tais solventes não se encaixa nos princípios da química analítica verde, uma vez que tais solventes são voláteis, inflamáveis, tóxicos e explosivos. Além disso, o volume de resíduos gerados em uma única análise de humulonas e lupulonas em lúpulo é expressivo, com cerca de 120 mL para cada replicata de extração (ASBC, 2010). Ademais, quando se considera o escalonamento deste processo de extração, por exemplo, em análises de controle de qualidade para uma indústria cervejeira, na qual são realizadas dezenas de análises ao dia, esse volume de resíduos de solventes tóxicos é amplificado. Desta forma, nossa hipótese foi miniaturizar o processo de extração sólido-líquido (máximo de 1000  $\mu$ L por replicata de extração), bem como

substituir os solventes orgânicos clássicos por produtos naturais como é o caso dos terpenos (também conhecidos também como terpenoides ou isoprenoides).

A grande vantagem do uso de terpenos como solventes, é que estes são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas, como é o caso do limoneno, que é o terpeno majoritário ( $\geq 80\%$ ) do óleo essencial de casca da laranja, e que é obtido como um subproduto do processo de obtenção do suco de laranja. Em outras palavras, os terpenos por serem de origem vegetal, contribuem para o sequestro de carbono da atmosfera, através da fotossíntese das plantas dos quais são obtidos. Não precisam de síntese química para sua obtenção, são menos tóxicos, voláteis e explosivos se comparados a solventes orgânicos convencionais (i.e., éter dietílico, metanol ou tolueno) utilizados nas análises de lúpulo como.

A seguir, será apresentada uma breve revisão sobre a química do lúpulo, dos terpenos e, em seguida, serão apresentados os principais resultados e discussões relativos à parte experimental desta pesquisa.

## **1.6 O lúpulo e os analitos alvo deste estudo**

O lúpulo (*Humulus Lupulus* Linnaeus) é uma planta trepadeira perene, que produz flores ricas em fitoquímicos de interesse para indústria cervejeira, isto é, resinas amargas, antioxidantes naturais e compostos de sabor (Durello, Silva, Bogusz, 2019). Em especial, as resinas amargas são fonte de humulonas e lupulonas, compostos responsáveis pelo amargor, frescor, equilíbrio de sabor e pela sensação de saciedade que a cerveja proporciona (Baxter & Hughes, 2001).

Quimicamente, as humulonas (ou  $\alpha$ -ácidos) são um grupo de compostos formado pela mistura de cinco moléculas orgânicas relacionadas: humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona (Durello, Silva, Bogusz, 2019). Por sua vez, as lupulonas (ou  $\beta$ -ácidos) também correspondem a uma mistura de cinco congêneres: lupulona, colupulona, adlupulona, prelupulona e poslupulona (Durello, Silva, Bogusz, 2019). A Figura 5 representa as estruturas químicas das humulonas e lupulonas do lúpulo.



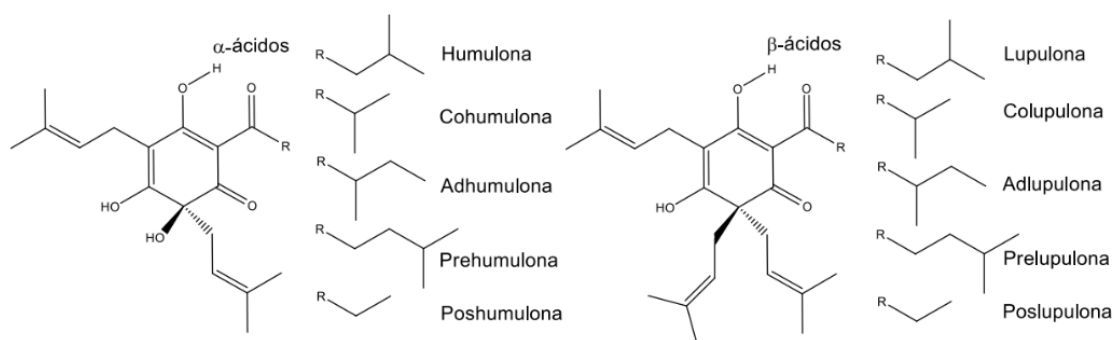


Figura 5. Estruturas químicas das humulonas e lupulonas do lúpulo. Fonte: adaptado de karabín et al., 2016.

A análise química de humulonas e lupulonas em lúpulo é fundamental para a produção cervejeira pois, como o lúpulo é um componente essencial para a formulação e composição da bebida, faz-se necessário calcular o quanto de lúpulo é necessário para o processo de fabricação de cerveja. Além disso, o teor de humulonas e lupulonas em lúpulo também é útil para que se possa estabelecer o preço de comercialização do lúpulo.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi realizar uma prova de conceito sobre a possibilidade de miniaturização e substituição dos solventes orgânicos clássicos por terpenos na etapa de preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Testar a eficiência de extração dos terpenos limoneno, eugenol e farnesol quanto a sua capacidade de extrair humulonas e lupulonas de lúpulo.
- Comparar os resultados obtidos com o uso de terpenos com a metodologia oficial de preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo com uso de solventes orgânicos seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Amostras de lúpulo**

As amostras de lúpulo utilizadas neste estudo consistiram em lúpulos peletizados comerciais das variedades Cascade, Sorachi ace e Comet, que foram adquiridas no comércio local da cidade de São Carlos – SP.

#### **3.2 Materiais, reagentes e padrões**

Nas análises foram utilizados: metanol grau HPLC (J. T. Baker), ácido fosfórico 85% (Macron Fine Chemicals), tolueno grau HPLC (Honeywell), acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker), EDTA (J. T. Baker), limoneno, eugenol e farnesol (Sigma Aldrich), corante Vermelho do Nilo (98%, MedChemExpress) e água ultra purificada em sistema Milli-Q. Para a quantificação dos analitos foi utilizado o padrão de humulonas e lupulonas ICE-4 da *American Society of Brewing Chemists*.

#### **3.3 Determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo**

A determinação de humulonas e lupulonas nas amostras seguiu o método oficial da *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), Hops-12, conforme descrito a seguir. Inicialmente pesaram-se 10 g de lúpulo peletizado, que foram devidamente triturados em um almofariz. Em seguida, pesaram-se  $5 \pm 0,001$  g da amostra triturada em um Erlenmeyer de 250 mL (envolto em papel alumínio para proteção da amostra frente a incidência direta da luz) e então adicionaram-se 100 mL de tolueno. O Erlenmeyer foi tampado com uma rolha de silicone e a mistura foi agitada com auxílio de um agitador magnético e de uma barra de agitação magnética por 30 minutos. Após a extração, a amostra foi centrifugada (3000 RPM por 5 min.) para separação do material particulado. Então, foram pipetados 5,0 mL da fase sobrenadante límpida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com tolueno. Após misturar o conteúdo do balão volumétrico uma alíquota da amostra foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m e injetada no HPLC.

A separação cromatográfica das humulonas e lupulonas foi realizada em um HPLC Shimadzu, dotado de uma coluna XDB-C18, (4,6  $\times$  250 mm e 5  $\mu$ m de

partícula). A fase móvel utilizada consistiu em uma mistura de 750 mL de metanol, 240 mL de água Milli-Q, 5 mL de ácido fosfórico e 1 mL de EDTA 4% (fase A) e de acetonitrila (fase B). O gradiente iniciou com uma proporção 80% de fase móvel A e 20% de fase móvel B. Em seguida, seguiu-se com um incremento da fase B até 35%, a vazão de fase móvel no sistema de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, e detector operando em 314 nm. Para a construção das curvas de calibração, foi usado o padrão de humulonas e lupulonas ICE-4 em sete diluições diferentes (0,5; 3,0; 5,5; 8,0; 10,5; 13,0 e 15,5 mg mL<sup>-1</sup>). Os resultados quantitativos foram expressos em base seca a 10% de umidade.

### 3.4 Medida da polaridade dos solventes

Para se conhecer a polaridade dos solventes e dos terpenos, empregou-se o método do solvatocromismo, com uso do corante Vermelho do Nilo (98%, MedChemExpress), conforme procedimento descrito por Fernandes et al. (2021) com pequenas modificações: preparou-se uma solução etanólica de 1 mg mL<sup>-1</sup> do corante Vermelho do Nilo que foi usada para a diluição (1:200) nos diferentes solventes. Em seguida obteve-se o espectro de varredura dos solventes de 200 a 800 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-1700 (Shimadzu). O ensaio foi feito em triplicata para cada solvente, e o comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda_{max}$ ) de cada amostra foi usado para calcular o parâmetro de polaridade (energia de transição, ENR), de acordo com a Equação 1 abaixo:

$$E_{NR}(kcal\ mol^{-1}) = \frac{28.591}{\lambda_{max}} \quad \text{Equação (1)}$$

### 3.5 Testes de solubilidade das humulonas e lupulonas nos terpenos

Os testes de solubilidade dos analitos nos diferentes solventes (i.e., tolueno, limoneno, eugenol e farnesol) foi realizado pela diluição de 0,01 mg do padrão ICE-4 em 1 mL de cada solvente, com auxílio de banho ultrassônico por 30 minutos. Após a diluição as amostras foram filtradas em filtro seringa de membrana de celulose regenerada de 0,22  $\mu$ m e injetadas no HPLC. As áreas dos analitos foram comparadas e o solvente capaz de fornecer as maiores áreas no cromatograma foi selecionado para as etapas posteriores.

### 3.3.4 Extração de humulonas e lupulonas de Lúpulo com eugenol

As amostras tiveram seu conteúdo de humulonas e lupulonas determinado pelo método oficial da ASBC Hops – 12 e, em seguida pelo método miniaturizado empregando o terpeno eugenol como solvente extrator. Para isso foram utilizados 10 mg de lúpulo que foram extraídos com 1 mL de eugenol sob agitação magnética por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, filtradas membrana de celulose regenerada de 0,22 µm e injetadas no HPLC. O mesmo foi realizado com tolueno.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Teores de humulonas e lupulonas nas amostras pelo método oficial

Inicialmente, foram realizadas determinações dos teores de humulonas e lupulonas nas amostras de lúpulo segundo o método oficial da ASBC Hops – 12, com o intuito de aprendizado com a etapa de preparo de amostras e familiarização com a operação do HPLC. Um cromatograma ilustrando a separação dos analitos pode ser visualizado na Figura 6.

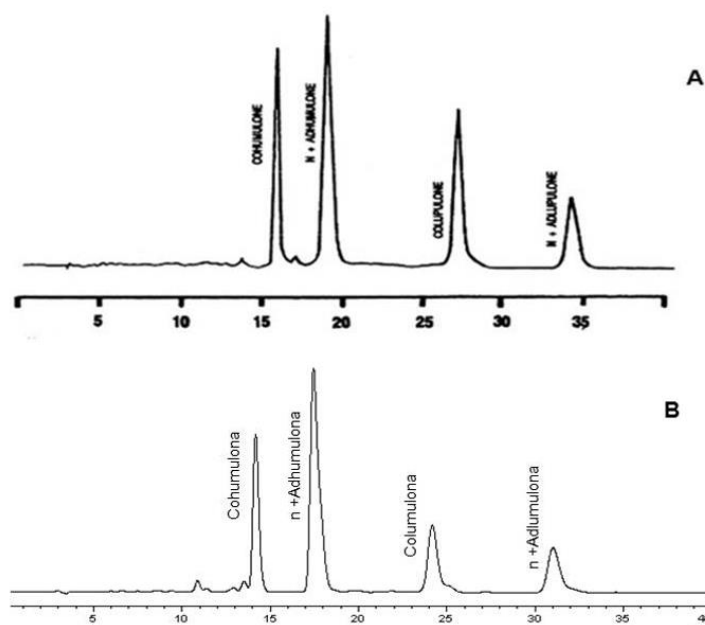


Figura 6 - Comparativo entre os cromatogramas de humulonas e lupulonas: A) conforme descrito na no método da ASBC Hops- 12 e B) obtido em nosso laboratório.

É importante destacar, que embora existam cinco humulonas e cinco lupulonas, na metodologia oficial de referência, isto é, da ASBC Hops- 12, consideram-se apenas quatro bandas no cromatograma, isto é, duas bandas para humulonas (cohumulona e N + adhumulona) e duas bandas para lupulonas (colupulona e N + adlupulona). Ou seja, a segunda e a quarta banda correspondem a quantificação aos pares.

Após se obter uma separação adequada dos analitos, procedeu-se a determinação dos analitos nas amostras dos lúpulos Cascade, Sorachi ace e Comet. A quantificação dos analitos foi realizada com o padrão ICE-4 que nada mais é do que um extrato supercrítico de lúpulo certificado, isto é, cuja quantidade de humulona e lupulona foi determinada através de ensaios de proficiência. Os resultados destas determinações podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados (média  $\pm$  desvio padrão) dos teores de humulonas e lupulonas expressos em base seca a 10% de umidade.

<b>Lúpulo</b>	<b>% Humulonas <math>\pm</math> SD</b>	<b>% Lupulonas <math>\pm</math> SD</b>
Cascade	7,53 $\pm$ 0,35	10,14 $\pm$ 0,42
Comet	6,39 $\pm$ 0,14	5,15 $\pm$ 0,35
Sorachi Ace	10,68 $\pm$ 0,12	11,05 $\pm$ 0,06

Os teores de humulonas e lupulonas nas amostras são condizentes com a literatura, uma vez que, segundo a literatura, são esperados para a variedade Cascade teores de 4 a 9% de humulonas e 5,5 a 9% de lupulonas. Enquanto que para a variedade Comet são esperados teores de 6 a 10,5% de humulonas e 4 a 5,5% de lupulonas. E, finalmente, para a variedade Sorachi Ace são esperados teores de 10 a 12,5% de humulonas e 6,5 a 12 % de lupulonas.

#### **4.2 Medida da polaridade dos solventes**

Quando pensamos em um solvente, a sua constante dielétrica é uma das propriedades químicas fundamentais para entendermos a sua capacidade de ligação de hidrogênio e, conseqüentemente, sua polaridade Fernandes et al. (2021). Neste sentido, solvatocromismo é o fenômeno observado quando a cor de uma solução é muda em função da dissolução de um soluto em diferentes solventes. O efeito solvatocrômico revela como o espectro de uma substância (o soluto) varia quando

este se encontra dissolvido em diferentes solventes. Quimicamente, o que ocorre é que existe um efeito no estado eletrônico fundamental e no estado excitado do soluto, de modo que o tamanho da lacuna de energia entre eles muda conforme o solvente muda. E isso se reflete no espectro de absorção ou emissão do soluto como diferenças na posição, intensidade e forma das bandas espectroscópicas. Quando a banda espectroscópica ocorre na parte visível do espectro eletromagnético, a solvatocromia é observada como uma mudança de cor Fernandes et al. (2021).

A Tabela 2 mostra os resultados de comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda$  max) e valores de energia de transição (ENR) (a 25 °C) obtidos pela dissolução de limoneno, eugenol, farnesol e tolueno no corante Vermelho do Nilo. É possível observar que os valores de ENR variaram de, aproximadamente, 50,5 (eugenol) a 50,4 (limoneno), enquanto que o tolueno apresentou uma ENR de 54,6. Basicamente, a ENR calculada é inversamente proporcional à polaridade do solvente, uma vez que quanto mais apolar o composto, maior a energia necessária para atrair cargas elétricas. Assim sendo, o solvente mais polar entre os testados (e, portanto, com menor energia de transição) foi o Eugenol, o que pode ser vantajoso para a extração das humulonas e lupulonas, uma vez que são moléculas semi-polares.

Tabela 2. Resultados das medidas de comprimento de onda de absorbância máxima ( $\lambda$ max) e valores de energia de transição (ENR) (a 25 °C) para limoneno, eugenol, farnesol e tolueno.

<b>Solvente</b>	<b><math>\lambda</math> max (nm)</b>	<b>ENR (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>
Limoneno	520,6	54,91 ± 0,02
Eugenol	565,8	50,53 ± 0,02
Farnesol	541,8	52,82 ± 0,02
Tolueno	523,4	54,64 ± 0,02

Fonte: autoria própria.

Na figura 7, pode-se observar as diferentes cores obtidas pela dissolução dos solventes no corante Vermelho do Nilo. Analisando os resultados obtidos, observa-se que as cores e, portanto, as energias de transição foram relativamente próximas para os compostos testados, a exceção do eugenol. Tais resultados indicam que os terpenos testados nesta etapa do estudo podem ser utilizados como substitutos do solvente orgânico tolueno se considerarmos a sua ENR.

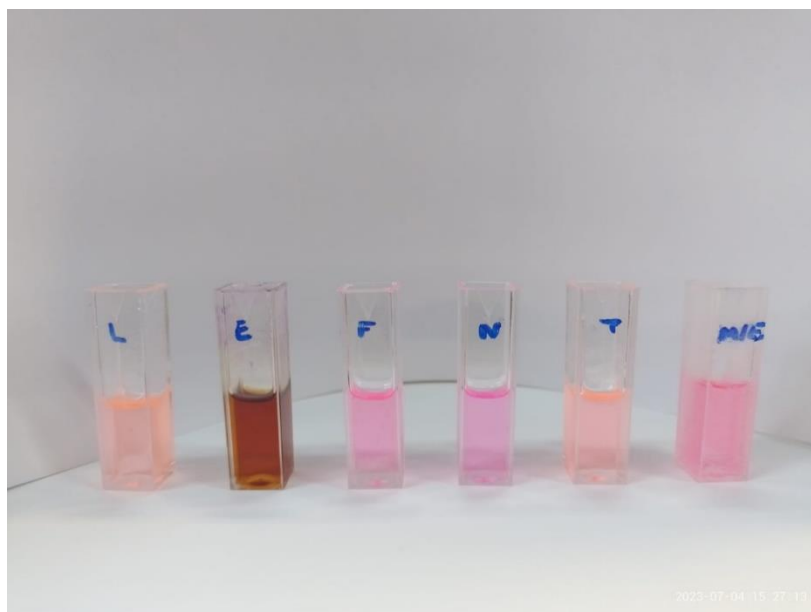


Figura 7. Aspecto visual obtido pela dissolução dos solventes no corante Vermelho do Nilo para obtenção de um indicativo de sua polaridade por Solvatocromismo.

#### 4.3 Testes de solubilidade das humulonas e lupulonas nos terpenos

Com o objetivo de propor uma técnica mais alinhada com os princípios da química verde e da química analítica verde no preparo de amostras para a extração de humulonas e lupulonas foram realizados testes de solubilidade do padrão ICE-4 em limoneno, eugenol, farnezol e tolueno. Todos os testes foram conduzidos na proporção de 1 mg de extrato para 1 mL de solvente. Na Figura 8 pode se observada uma foto do sistema utilizado para os testes de diluição.



Figura 8. Fotografia do experimento de dissolução do padrão ICE-4 em limoneno, eugenol, farnezol e tolueno. Fonte: autoria própria.

Por se tratar de um extrato supercrítico o ICE-4 é um excelente material para testes, uma vez que representa as concentrações reais que podem ser encontradas em amostras de lúpulo. Além disso, como o ICE-4 é um padrão certificado, sua concentração de humulonas e lupulonas é conhecida.

Após agitação por 30 minutos, as amostras foram centrifugadas, filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetadas no HPLC para obtenção das áreas das humulonas e lupulonas. Na Figura 9 pode se observado um cromatograma ilustrativo para a extração utilizando o terpeno eugenol.

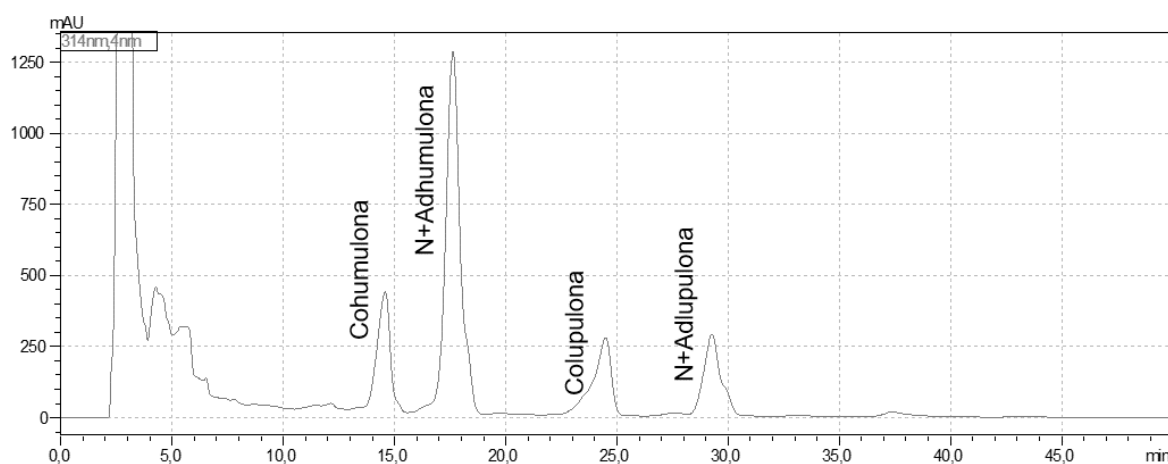


Figura 9. Cromatograma ilustrativo para a separação de humulonas e lupulonas no teste de dissolução do padrão ICE-4 com eugenol.

Os resultados dos testes de solubilidade expressos em área das bandas cromatográficas, para cada solvente investigado pode ser visualizada na Figura 10. É possível observar nesta figura que os terpenos forneceram maiores áreas para os picos de humulonas e lupulonas no cromatograma se comparados ao tolueno. O que possivelmente está relacionado a maior solubilidade dos analitos nos terpenos em comparação com o tolueno, como foi sugerido anteriormente nos ensaios de solvatocromismo. Além disso, também se pode observar que os maiores valores de área foram obtidos com o uso do terpeno eugenol, seguido pelo limoneno e pelo farnesol. Em relação ao perfil de solubilidade do farnesol este diferiu muito em relação ao tolueno, uma vez que o farnesol forneceu maiores valores de área para cohumulona que os demais solventes. Ademais, o perfil de solubilidade do limoneno



foi o que forneceu as menores áreas de N+adlupulona, sendo que este perfil também foi diferente do perfil obtido com uso do tolueno. Sendo assim, o terpeno que forneceu as maiores áreas e o perfil mais semelhante ao tolueno foi o eugenol.

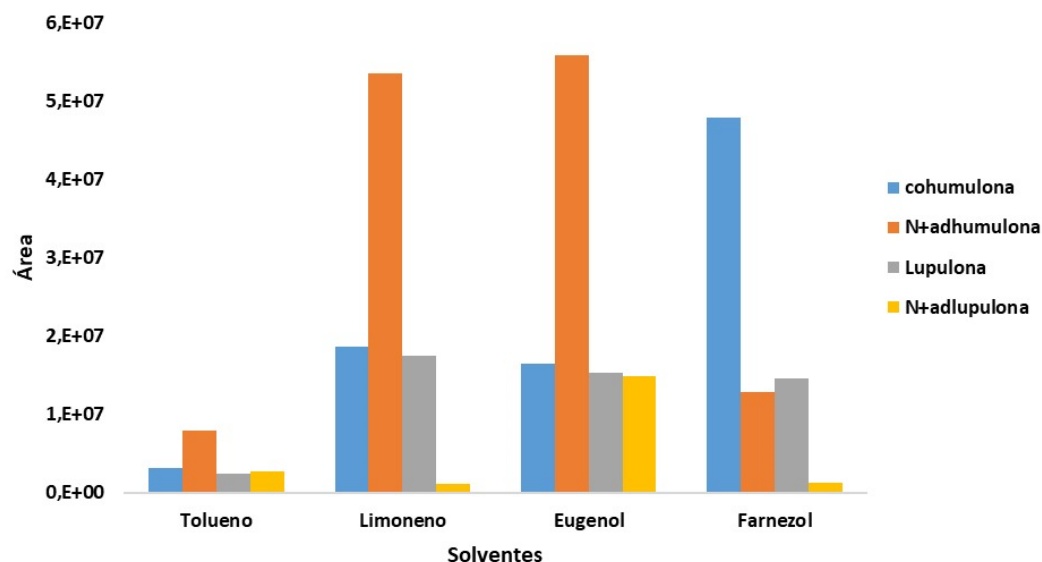


Figura 10. Gráfico representativo da eficiência de solubilização de humulonas e lupulonas nos dos diferentes solventes limoneno, eugenol, farnesol e tolueno.

#### 4.4 Teste de extração de humulonas e lupulonas de lúpulo com eugenol

Os resultados animadores obtidos com os testes de solubilidade empregando eugenol como solvente sugerem que é possível solubilizar e, possivelmente, também extrair humulonas e lupulonas do lúpulo uso de eugenol no lugar de tolueno. Em função disso, preparamos uma extração de humulonas e lupulonas de uma das amostras de lúpulo (Cascade) anteriormente analisadas empregando o eugenol como solvente extrator. Um cromatograma ilustrativo desta extração pode ser observado na Figura 11.

É possível observar que o cromatograma obtido foi muito semelhante aquele que se obteve com os testes de solubilidade. Indicando que a aplicabilidade prática do uso de eugenol como solvente verde e ambientalmente amigável na etapa de preparo de amostras para análise química de lúpulo e perfeitamente possível.

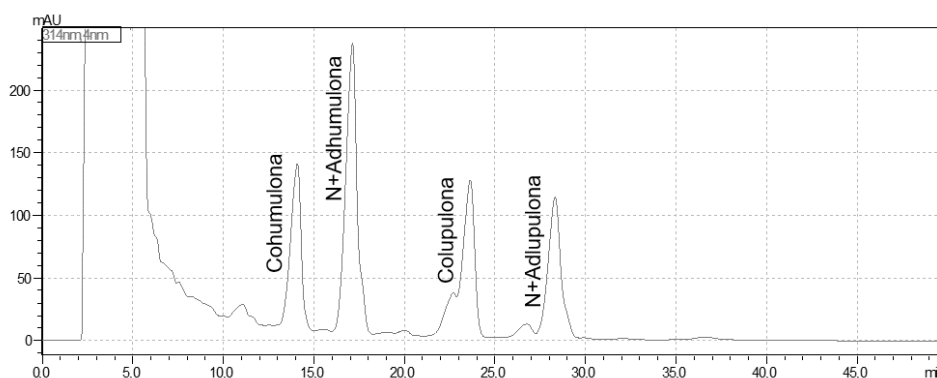


Figura 11. Cromatograma ilustrativo da separação de humulonas e lupulonas obtidas no teste de extração de uma amostra de lúpulo Cascade com eugenol como solvente extrator.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Nesta monografia de conclusão de curso foi apresentada uma revisão bibliográfica sobre o histórico das discussões sobre problemas ambientais no mundo e sua relação com a química verde. Foi também apresentada uma breve revisão sobre a química verde e a química analítica verde e sua relação com o conceito de sustentabilidade.

Em seguida, realizou-se uma prova de conceito, sobre a possibilidade de se miniaturizar o volume de solvente no preparo de amostras para análise de humulonas e lupulonas em lúpulo, bem como se investigou a possibilidade de se utilizar terpenos no lugar do tolueno como solvente extrator.

O preparo de amostras teve uma redução de 100 vezes no volume de solvente empregado e, dos terpenos testados, o eugenol foi aquele capaz de solubilizar e extrair os analitos de interesse de maneira mais adequada. E, embora não tenha havido tempo para determinações quantitativas com uso de eugenol como solvente extrator, os resultados preliminares aqui obtidos sugerem a continuidade deste estudo, com a adequada validação do método analítico e comparação de resultados quantitativos com o método oficial de análise.

Finalmente, sugere-se o cálculo da eco-escala para se conhecer o “greenness” da etapa de preparo de amostras em comparação a metodologia que utiliza tolueno na extração de humulonas e lupulonas de lúpulo.

## 6. Referências Bibliográficas

Marco, B.A; Rechelo, B.S.; Tótolí, E.G.; Kogawa, A.C.; Salgado, H.R.N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: a review. Saudi Pharmaceutical Journal, 2019, 27, 1, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>

Tobiszewski, M.; Mechlińska, A.; Zygmunt, B.; Namieśnik, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28, 8, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>

Gałaszka, A; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013, 50, 78-84, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

Anastas, P.T.; Warner, J.C. Green chemistry: theory and practice, Oxford University Press, Oxford, 1998. ISBN: 9780198506980

Anastas, P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1999, 29, 3, 167-175, <https://doi.org/10.1080/10408349891199356>

Namieśnik, J. Trends in environmental analytics and monitoring, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2000, 30, 2-3, 221-269, <https://doi.org/10.1080/10408340091164243>

Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Green analytical chemistry. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27, 6, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>

Farias, L.A., Fávaro, D.I.T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. Química Nova, 2011, 34, 6, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600030>

Lutts, R.H. Chemical fallout: Rachel Carson's Silent Spring, radioactive fallout, and the environmental movement. Environmental Review, 1985, 9, <https://www.journals.uchicago.edu/doi/epdf/10.2307/3984231>

Woodhouse, E.J.; Breyman, S. Green Chemistry as Social Movement? Science Technology and Human Values. 2005, 30, 2, 199 – 222, DOI: 10.1177/0162243904271726

Lago, A.A.C. Estocolmo, Rio, Joanesburgo: o Brasil e as três conferências ambientais das Nações Unidas. 2007, 1ª Edição, 274 p., ISBN: 978-85-7631-040-6.

Goulart, M.O.F.; Zuin, V.G. 43º Congresso Mundial de Química (IUPAC 2011): fatos e reflexões. Química Nova, 2011, 34, 1301, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000800001>

Prado, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. Química Nova, 2003, 26, 5, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500018>

Revista Exame. Vítimas de tragédia em Mariana podem receber indenização em 2017. Disponível em: <https://exame.com/brasil/vitimas-de-tragedia-em-mariana-podem-receber-indenizacao-final-em-2017>, acesso em dezembro de 2023.

Prat, D.; Hayler, J.; Wells, A. A survey of solvent selection guides. Green Chemistry, 2014, 16, 4546-4551, <https://doi.org/10.1039/C4GC01149J>

Kogawa, K.; Carolina, A.; Salgado, S.V.; Nunes, H.R. Analytical methods need optimization to get innovative and continuous processes for future pharmaceuticals. Scholars Academic Journal of Pharmacy, 2016, 5, 6, 240-244, DOI: [10.21276/sajp.2016.5.6.3](https://doi.org/10.21276/sajp.2016.5.6.3)

ONU. Organização das Nações Unidas. Plataforma Agenda 2030. Disponível em <http://www.agenda2030.org.br/ods/12/> Acesso em: 18-12-2023.

American Society of Brewing Chemists, Hops 14.  $\alpha$ -and  $\beta$ -Acids in Hops and Hop Extratcts, 2010, doi: [10.1094/ASBCMOA-Hops-14](https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Hops-14)

Durello, R.S.; Silva, L.M.; Bogusz, S. Química do lúpulo. Química Nova, 2019, v. 42, 8, 900-919, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

Baxter, E. D.; Hughes, P.S. Beer: Quality, safety and nutritional aspects. Royal Society of Chemistry; 1 a Edição, 2001. ISBN: 0-8 5404-58 8-0.

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, 2016.

American Society of Brewing Chemists, Hops 4. Moisture, 2010, Doi: [10.1094/ASBCMOA-Hops-4](https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Hops-4).

Fernandes, C.C.; Haghbakhsh, R.; Marques, R.; Paiva, A.; Carlyle, L.; Duarte, A.R.C. Evaluation of deep eutectic systems as an alternative to solvents in painting conservation. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021, 9, 46, 15451-15460, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04591>