

**OLIVIA PAK CAMPOS**

**ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E DENSIDADE DE TRICOMAS DE VARIEDADES  
DE *Humulus lupulus* L. SOB MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

**Botucatu**

**2021**



**OLIVIA PAK CAMPOS**

**ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E DENSIDADE DE TRICOMAS DE VARIEDADES  
DE *Humulus lupulus* L. SOB MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrônômicas da Unesp *Campus*  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Horticultura)

Orientador: Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini  
Bonfim

Coorientadora: Prof. Dra. Rosani do Carmo  
de Oliveira Arruda

**Botucatu**

**2021**

C198a	<p>Campos, Olivia Pak</p> <p>Anatomia, histoquímica e densidade de tricomas de variedades de <i>Humulus lupulus</i> L. sob manejo orgânico e convencional / Olivia Pak Campos. -- Botucatu, 2021</p> <p>59 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu</p> <p>Orientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim</p> <p>Coorientadora: Rosani do Carmo de Oliveira Arruda</p> <p>1. Lúpulo cultivado. 2. Morfologia. 3. Anatomia vegetal. 4. Óleo essencial. 5. Compostos fenólicos. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E DENSIDADE DE TRICOMAS DE VARIEDADES DE *Humulus Lupulus* L. SOB MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL

**AUTORA:** OLIVIA PAK CAMPOS

**ORIENTADOR:** FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

**COORIENTADORA:** ROSANI DO CARMO DE OLIVEIRA ARRUDA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM (Participação Virtual)  
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Prof.ª Dr.ª JORDANY APARECIDA DE OLIVEIRA GOMES (Participação Virtual)  
Pós-Doutoranda - Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. FLÁVIA MARIA LEME (Participação Virtual)  
Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Botucatu, 25 de fevereiro de 2021



*Aos meus amados pais Antônio Ruy e Song,  
aos meus irmãos Jeremias e Flora,  
Dedico.*





## AGRADECIMENTOS

“Andorinha sozinha não faz verão”, tenho isso como lei de vida, por esse motivo sou grandemente agradecida a todos que me acompanharam e/ou acompanham minha jornada.

À minha Ohana. Aos meus pais Antônio Ruy Régis de Campos e Song Hi Pak Campos, que construíram ponte de privilégios sob a qual tenho caminhado; aos meus irmãos Jeremias Pak Campos e Flora Régis Pak Campos; ao meu namorado Daniel Callili; a minha cunhada Susana Sales, agradeço pelo zelo, carinho, incentivo e apoio, vocês são a minha motivação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim, que ao longo da orientação deu suporte, ensinou, participou de maneira assídua, e ainda, se fez amigo.

A minha coorientadora Prof. Dra. Rosani de Carmo de Oliveira Arruda, por ser tão solícita e por tanto agregar.

A técnica Dra. Flávia Maria Leme que me ensinou, pacientemente, todas as metodologias de análises anatômicas, e me acolheu em seu lar carinhosamente.

A pós-doutoranda Jordany Ap. de Oliveira Gomes que desde o início contribuiu com o desenvolvimento do trabalho, sanando várias dúvidas, sempre de prontidão.

Aos meus parceiros de campo e amigos Gabriel Fortuna e Caio Scardini, pelas várias trocas de conhecimentos e união no trabalho. Aos estagiários que passaram e aos que ainda participam pela força e por deixarem o ambiente mais alegre. Ao grupo de pesquisa HorgBio pela colaboração mútua.

Ao Programa de Pós-Graduação, a FCA-UNESP, e seus professores e funcionários pelo profissionalismo e assistência.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

As boas amizades que tornaram minha estada em Botucatu prazerosa e feliz, obrigada pela cumplicidade Mariah, Lia, Sarah, Aline, Flora, Ruan e Roque.

Com o coração gigante, muito obrigada!



## RESUMO

O lúpulo é atualmente cultivado quase que exclusivamente para fabricação de cerveja. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial da bebida, contudo é grande importador de lúpulo, devido à ausência de cultivo nacional estabelecido. O interesse pelo lúpulo está nos cones (inflorescências femininas), onde estão presentes as estruturas sintetizadoras de lupulina, que é composta por resinas, compostos fenólicos e óleos essenciais, responsáveis pelas propriedades bioativas. Fatores ambientais influenciam teores dos compostos bioativos, tanto quanto a variedade e condições de cultivo. A anatomia de estruturas secretoras vegetais possibilita entender o funcionamento da planta e assim desenvolver técnicas para incremento na produção. Sendo assim, O objetivo deste trabalho foi descrever morfológicamente a parte aérea do lúpulo, identificar tricomas que ocorrem na inflorescência e avaliar a densidade e anatomia dos tricomas peltados, determinar o teor de óleo essencial e compostos fenólicos totais de cinco variedades de lúpulo cultivadas sob manejo orgânico e convencional na cidade de Botucatu – SP, a fim de gerar informações que subsidiem o cultivo de lúpulo no estado de São Paulo. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, em parcelas subdivididas 2 x 5, sendo fator principal: sistemas de cultivo; e fator secundário: variedades. Para descrição morfológica foram feitos registros fotográficos e descritas as características da planta. O comprimento dos cones foi obtido através da média de 30 amostras. Para identificação de tricomas e densidade de tricomas peltados foram feitas micrografias em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para anatomia e histoquímica, amostras de cones foram fixadas em formalina neutra tamponada, e processadas seguindo as técnicas usuais de anatomia vegetal e submetidas a corantes e reagentes. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger, cujo rendimento foi determinado com base na matéria seca. O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos não influenciaram o comportamento morfológico das plantas, porém, maiores médias de comprimento de cones foram observadas em sistema orgânico nas variedades Cascade e Chinook. Foram identificados três tipos de tricomas na inflorescência: tector, glandular peltado e glandular bulboso, independente dos tratamentos utilizados. Para densidade de tricomas nas brácteas, houve diferença apenas entre variedades, onde, a ‘Cascade’ apresentou maior média e a ‘Hallertau Mittelfrueh’ menor. Para densidade de tricomas nas flores houve interação significativa entre os sistemas e variedades, com exceção da ‘Nugget’, as variedades apresentaram médias superiores em manejo orgânico, com destaque para ‘Hallertau Mittelfrueh’ e ‘Chinook’. A análise histoquímica revelou presença de polissacarídeos, amido, lipídeos, compostos fenólicos e proteínas nos tricomas peltados. Quanto ao teor de óleo essencial não houve interferência dos sistemas de produção, entretanto houve das variedades, a ‘Hallertau Mittelfrueh’ apresentou menores teores. Para compostos fenólicos não houve diferença significativa. Foram verificadas correlações positivas entre densidade de tricomas nas brácteas com teor de óleo essencial, densidade de tricomas nas flores com teor de

compostos fenólicos, teor de óleo essencial com teor de compostos fenólicos, e comprimento de cone com teor de compostos fenólicos. De maneira geral, nas condições estudadas, se destacam as variedades Chinook e Cascade, e o sistema orgânico de produção.

**Palavras-chave:** Bioativos. Lupulina. Lúpulo. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Morfologia.

## ABSTRACT

Hop is currently grown almost exclusively for the brewing industry. Brazil is the third largest producer of beer of the world, however is a big importer of hop, due to the lack of established national cultivation. The interest in hop is related to the cones (female inflorescences), where the synthesizing structures of lupulin are present, which is composed of resins, phenolic compounds and essential oils, which are responsible for bioactive properties. Environmental factors influence contents of bioactive compounds as much as the variety and conditions of cultivation. The anatomy of plant secretory structures makes possible to understand the functioning of the plant and thus develop techniques for increasing production. Thus, the aim of this work was to describe morphologically the aerial part of the hop, identify, evaluate the density and anatomy of the trichomes that occur in the inflorescence, determine essential oil content and total phenolic compounds of five hop varieties cultivated in organic and conventional systems in the city of Botucatu - SP, to generate information that subsidizes hops growing in the state of São Paulo. The experiment was conducted in completely randomized design, in 2 x 5 split-plot, being the main factor: cultivation systems, and the secondary factor: varieties. For morphological description, photographic records were made and the characteristics of plant were described. The length of cones was obtained by averaging 30 samples. For identification of trichomes and density of glandular peltate trichomes, were made micrographs of scanning electron microscopy (SEM). For anatomy and histochemistry cones samples were fixed in FNT, and processed following the usual techniques of plant anatomy and subjected to dyes and reagents. The essential oil was obtained by hydrodistillation in Clevenger apparatus, whose yield was determined based on dry matter. The phenolic compounds content was determined using the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. The results obtained showed the treatments did not influence the morphological behavior of the plants, however, higher mean cones lengths were observed in the organic system, and in the varieties Cascade and Chinook. Three types of trichomes were identified: tector, glandular peltate and glandular bulbous, regardless of the treatments. For trichome density in bracts, was a difference only between varieties, where 'Cascade' had a higher average and 'Hallertau Mittelfrueh' less. Regarding density of trichomes in flowers, there was a significant interaction between systems and varieties, except 'Nugget', the varieties show higher averages in organic system, with emphasis on 'Hallertau Mittelfrueh' and 'Chinook'. Histochemical analysis revealed the presence of polysaccharides, starch, lipids, phenolic compounds and proteins in the glandular peltate trichomes. For essential oil content, was no difference between the systems, however was between the varieties, in both systems the 'Hallertau' showed lower levels. For phenolic compounds was no significant difference. Positive correlations were observed between density of trichomes in bracts with essential oil content, density of trichomes in flowers with phenolic compounds content, essential oil content with phenolic compounds content, and cone length with phenolic compounds content. In general, under the conditions studied, the Chinook and Cascade varieties, and the organic production system stood out.

**Keywords:** Bioactive. Hop. Lupulin. Scanning electron microscopy (SEM). Morphology.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L., Cannabaceae) e variedades</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Estruturas secretoras e metabolismo secundário</b> .....	<b>21</b>
2.2.1	Compostos fenólicos .....	23
2.2.2	Óleo essencial.....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterização da área experimental</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Tratamentos e delineamento experimental</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Caracterização do cultivo</b> .....	<b>27</b>
3.3.1	Tratos culturais.....	29
<b>3.4</b>	<b>Avaliações</b> .....	<b>30</b>
3.4.1	Descrição morfológica e comprimento de cones.....	30
3.4.2	Identificação de tricomas e densidade de tricomas glandulares peltados .....	31
3.4.3	Análise anatômica e histoquímica do tricoma glandular peltado .....	32
3.4.4	Teor de óleo essencial .....	32
3.4.5	Teor de compostos fenólicos totais .....	33
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Descrição morfológica e comprimento dos cones</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Tipos de tricomas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Densidade de tricoma glandular peltado</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Anatomia e histoquímica do tricoma glandular peltado</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5</b>	<b>Teor de óleo essencial e compostos fenólicos totais</b> .....	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Correlação de Pearson</b> .....	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>





## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, com produção anual de 13,3 bilhões de litros, com 117 mil hectares de área cultivada com matéria-prima (cereais), gerando faturamento de R\$ 77 bilhões, equivalente a 2% do PIB (SINDCERV, 2017). Contudo, o país se destaca como maior importador de lúpulo da América do Sul, adquirindo o produto da Alemanha (55%) e Estados Unidos (43%), ao custo de aproximadamente de US\$ 35 milhões ao ano, que equivale a 2,4 mil toneladas de lúpulo (CERVBRASIL, 2016; SILVA, 2017). Condição essa que torna a produção da bebida mais onerosa e de qualidade reduzida, em decorrência do transporte e tempo de armazenamento do lúpulo, isso ocorre devido à ausência de produção nacional estabelecida, mesmo diante da alta demanda interna (FAO STAT, 2015; CEOLA, 2020).

O interesse comercial pelo lúpulo se dá essencialmente pelas inflorescências femininas, também chamadas de cones, onde estão presentes as estruturas sintetizadoras e armazenadoras de lupulina (MARCOS *et al.*, 2011). Essas estruturas secretoras, contêm grandes quantidades de resinas, compostos fenólicos e óleos essenciais (FARAG e WESSJOHANN, 2013), substâncias essas responsáveis pelas propriedades medicinais anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes, dentre outras (KONDO, 2003; COWAN, 1999; SAKAMOTO e KONINGS, 2003). A resina encontrada nos cones é constituída por alfa e beta ácidos, que conferem a cerveja o sabor. Os óleos essenciais são compostos químicos responsáveis pelo aroma (RODRIGUES, MORAIS e CASTRO, 2015). Os polifenóis contribuem para a coloração, além de promover estabilidade coloidal da espuma através da complexação com proteínas (BOULTON, 2013). Esses compostos também atuam na manutenção das características sensoriais do produto final, além de auxiliar na saúde, pois possuem ação antioxidante, que é caracterizada pela capacidade de doar um átomo de hidrogênio a um radical livre (BOULTON, 2013; GIADA e MANCINI FILHO, 2006).

Fatores ambientais influenciam a formação de teores de compostos ativos, que compõem uma das características mais importantes na avaliação da qualidade do lúpulo. Apesar da existência do controle genético, a expressão dos metabólitos especializados pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH *et al.*, 1987). Os

metabólitos apresentam uma intensa interface química entre as plantas e o meio, logo, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Deste modo, o rendimento de óleo essencial assim como seu perfil químico é dependente da variedade em questão, tanto quanto da localização geográfica e condições de cultivo. Também do grau de maturidade no momento da colheita, método de secagem empregado e, tempo e condições de armazenamento, uma vez que se tratam de compostos voláteis que são extremamente sensíveis a alterações nas suas concentrações e composição (VENSKUTONIS, 1997; JELIAZKOVA *et al.*, 2018).

A descrição e classificação das estruturas vegetais e suas funções são objetos de estudo da anatomia vegetal. Estas informações podem identificar tendências adaptativas e auxiliar no entendimento do funcionamento das plantas em diversas condições ambientais (DICKISON, 2000). Concomitante, a histoquímica é utilizada para a identificação de substâncias, local de síntese e/ou de armazenamento no vegetal, por meio da aplicação de reagentes e soluções (DORES, 2007). Sendo assim, o uso destas técnicas possibilitam que estratégias de manejo sejam adotadas com maior eficiência para incremento na produção de metabólitos de interesse (DORES, 2007; GOBBO NETO; LOPES, 2007).

No Brasil, estudos sobre o cultivo de lúpulo são ainda insipientes, embora seja o terceiro maior produtor mundial de cerveja, conseqüentemente, com alta demanda interna de matéria-prima. Assim o cultivo do lúpulo nacional é uma importante estratégia para fomento da cadeia produtiva, de modo a possibilitar o desenvolvimento de produtos com identidade 100% brasileira. Visto que a composição química e teor dos óleos essenciais, compostos estes de interesse comercial para indústria cervejeira e farmacêutica, são influenciados tanto por fatores genéticos, quanto características agrônômicas e condições ambientais dos locais de cultivo (LAFONTAINE *et al.*, 2018), estudos que relacionem técnicas de cultivo, morfologia das variedades, densidade de tricomas e composição da secreção são importantes para indicar estratégias de cultivo e variedades com maior potencial econômico.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever morfológicamente a parte aérea do lúpulo, identificar, avaliar a densidade, anatomia e histoquímica de tricomas que ocorrem na inflorescência, e determinar o teor de óleo essencial e compostos fenólicos totais de cinco variedades de lúpulo cultivadas sob manejo orgânico e

convencional na cidade de Botucatu – SP, a fim de gerar informações que subsidiem o cultivo de lúpulo no estado de São Paulo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lúpulo (*Humulus lupulus* L., Cannabaceae) e variedades

O gênero *Humulus* pertence à família Cannabaceae, que em 2003 foi inserida a ordem Rosales (APG II, 2003), sendo representado por três espécies: *Humulus lupulus* L., *Humulus scandens* (Lour.) Merr. e *Humulus yunnanensis* Hu (The Plant List 2013). Apenas a espécie *H. lupulus* apresenta importância medicinal e industrial (SPÓSITO *et al.*, 2019).

O *H. lupulus* (lúpulo) é nativo da Europa e Ásia Ocidental, trata-se de uma espécie perene, herbácea, dioica, anemófila e trepadeira dextrogira (JELIAZKOVA *et al.*, 2018; SPÓSITO *et al.*, 2019). Com múltiplas aplicabilidades, é uma planta alimentícia, medicinal, com propriedades de conservação, comumente utilizado na indústria cosmética, e alternativa de fonte de fibra para indústria têxtil. Contudo, seu cultivo de forma massal é destinado à indústria cervejeira, o que perfaz expressivos 97% da produção mundial de lúpulo (RAISER, 2011; JELIAZKOVA *et al.*, 2018).

O etnoconhecimento em relação ao lúpulo descende da antiguidade. No século I, o escritor romano Plínio, descreveu o lúpulo (*H. lupulus*) como uma planta comumente encontrada em jardins e sendo uma espécie hortícola muito popular, consumido da mesma forma que os aspargos. Registros da antiga Babilônia mencionam “*sicera exluplis confectam*”, “bebida forte feita de lúpulo”. Em tempos medievais o lúpulo era utilizado para prolongar o prazo de validade de bebidas (JELIAZKOVA *et al.*, 2018).

O lúpulo é utilizado medicinalmente há mais de 2000 anos. Os primeiros registros datam do século XI, quando Arabicmedicus Mesue descreveu seus efeitos antiinflamatórios. Em 1158, a abadessa e botânica alemã, Hildegard von Bingen, confirmou indiretamente suas propriedades antimicrobianas. O manuscrito Jardim da Saúde (Anônimo 1485) descreve o efeito do lúpulo no tratamento de infecções de ouvido. No século XVI, o botânico alemão Hieronymus Bock documentou a primeira aplicação do lúpulo na ginecologia (KOETTER e BIENDL 2010). Desde o século XVIII, inflorescências do lúpulo eram colocadas em travesseiros para combater a insônia (SPÓSITO *et al.*, 2019).

O lúpulo é considerado uma commodity em vários países. Em 2018, os Estados Unidos foi o maior produtor da cultura, seguido da Alemanha, com produção de 48492 e 32527 toneladas, respectivamente (FAO, 2018).

O lúpulo é um dos principais ingredientes da cerveja, o Brasil o terceiro maior produtor da bebida do mundo (SINDCERV, 2017). Entretanto, a ausência de cultivo nacional de lúpulo estabelecido, leva o país ser um grande importador. Cerca de 2,4 mil toneladas de lúpulo são importadas ao ano, ao custo de aproximadamente US\$ 35 milhões (CERVBRASIL, 2016; SILVA, 2017).

O cultivo da espécie no Brasil é recente e passa por fases experimentais, ocorre de maneira geral em pequena escala. Contudo, esse cenário vem se modificando, a área de plantio de lúpulo na safra 17/18 foi de 18 hectares (SARNIGHAUSEN *et al.*, 2017). Os estados que possuem áreas de cultivo são: São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e Paraná (ALMEIDA, 2020).

O interesse comercial pelo lúpulo está nas inflorescências femininas, também denominadas cones, que são constituídas, majoritariamente por resinas (15-30%), óleos essenciais (0,5-3%), proteínas (15%), polifenóis (4%), ceras (traços-25%), celulose (43%) e aminoácidos (0,1%). A estrutura do cone consiste num eixo central no qual estão inseridas as brácteas que protegem as flores pistiladas, nesses órgãos se desenvolvem os tricomas glandulares peltados, conhecidos como glândulas de lupulina (ALMAGUER *et al.*, 2014). O valor do lúpulo está especialmente nessas glândulas que secretam diferentes ácidos, óleos essenciais e polifenóis. A essas substâncias são conferidas as propriedades antiinflamatórias, antibacterianas e organolépticas, que caracterizam a qualidade do lúpulo (KRALJ *et al.*, 1991).

O lúpulo é cultivado predominantemente em regiões de clima temperado, entretanto, alguns pesquisadores apontam a possibilidade de produção em diferentes climas, incluindo regiões semiáridas, marítimas, úmidas continentais e subtropicais, devido à grande quantidade de variedades disponíveis adaptadas a condições climáticas distintas (KAVALIER *et al.*, 2011).

Grande quantidade de variedades de lúpulo foi desenvolvida no mundo todo, variando o rendimento da biomassa, adaptação climática, desempenho agrônômico e produção de metabólitos especializados (PATZAK *et al.*, 2010). As diferentes variedades podem contrastar na proporção e composição de metabólitos, e ainda dentro de uma mesma variedade as oscilações do perfil químico é normal, uma vez

que é dependente dos fatores edafoclimáticos e bióticos externos (RONG *et al.*, 2000; BARTH, 2005). Sendo assim, o sistema de produção pode influenciar diretamente na produtividade e qualidade.

O cultivo do lúpulo gira em torno da produção de cerveja, por isso as variedades são tradicionalmente classificadas com base na sua composição química, em: lúpulo de amargor, de aroma ou duplo propósito. Esta distinção é de grande importância ao mestre cervejeiro, que irá fazer a seleção de variedades particulares para adicionar sabores e aromas à bebida. A utilização do lúpulo nas cervejarias é estabelecida, portanto, de acordo com seus óleos essenciais e alfa e beta-ácidos, ou seja, com a quantidade de compostos que conferem aroma e sabor (ROBERTS e WILSON, 2006). Tais compostos manifestam perfis químicos distintos em função da interação genótipo x ambiente. Algumas das variedades cultivadas mundialmente foram listadas a seguir.

‘*Cascade*’: Origem: Estados Unidos. Lançada em 1972, resultado do cruzamento entre ‘Serebrianka’ e ‘Fuggle’. Com potencial produtivo de 2017 a 2465 kg/ha, cones com 4,5 a 7% de alfa-ácidos, 4,5 a 7% de beta-ácidos e 0,8 a 1,5 mL de óleos essenciais/100g. Foi a primeira cultivar comercialmente aceita, com amargor relativamente baixo e aroma médio com tons florais e cítricos, representa 10% de todo lúpulo produzido nos Estados Unidos. Se desenvolve em áreas mais quentes e tolera solos alcalinos. Suscetível a ácaros, com notável resistência ao míldio e é ligeiramente suscetível ao oídio (BROOKS *et al.*, 1972; SPÓSITO *et al.*, 2019).

‘*Chinook*’: Origem: Estados Unidos. Lançada em 1985, proveniente do cruzamento entre ‘Peltham Golding’ e ‘63012M’. Com potencial produtivo de 2000 a 2400 kg/ha, cones com 12 a 14% de alfa-ácidos, 3 a 4% de beta-ácidos e 1,5 a 2,5 mL de óleos essenciais/100g. Super alfa híbrido de alto vigor e rendimento, de dupla aptidão, sendo amargo/aromatizante com aroma pesado; picante, pinho-resinoso com notas de toranja. Maior resistência a míldio e pragas em relação a maioria das variedades (KENNY e ZIMMERMANN, 1986; SPÓSITO *et al.*, 2019).

‘*Columbus*’: Origem: Estados Unidos. A linhagem exata da ‘Columbus’ é desconhecida. Com potencial de produção de 2000 a 2500 kg/ha, seus cones podem apresentar de 14 a 18% de alfa-ácidos, 4,5 a 6% de beta-ácidos e 1,5 a 2 mL de óleos essenciais/100g. Variedade de duplo propósito, de amargor triploide, aroma forte, cítrico, herbário e resinoso, popularmente usada em dry hopping. Tolerante ao calor e a solo alcalino, cresce em solos arenosos se devidamente fertilizado. Alta

susceptibilidade a oídio e míldio em condições de elevada umidade (HAUNOULD *et al.*, 1976; SPÓSITO *et al.*, 2019).

'*Hallertau Mittelfrueh*': Origem: Alemanha. Nativa da região de Hallertau, muito usada em programas de melhoramento, considerada um lúpulo nobre. Com potencial produtivo de 800 a 1100 kg/ha, possui concentração de 3 a 5,5% de alfa-ácidos, 3 a 5% de beta-ácidos e 0,7 a 1,3 mL de óleos essenciais/100g. É um lúpulo aromático, cultivado em grande parte da região sul da Alemanha, possui valores muito baixos de amargor, de aroma floral sutil e especiarias. Requer solos ácidos, bem drenados, ricos em ácidos húmicos. Pouco tolerante a alta temperatura durante a fase reprodutiva. Suscetível a míldio, oídio e outras doenças fúngicas. (KOHLMANN e KASTNER, 1975; SPÓSITO *et al.*, 2019)

'*Nugget*': Origem: Estados Unidos. Lançada em 1982, resultante do cruzamento diploide entre 'Brewers Gold' e um macho de alto teor de alfa-ácido com boas propriedades de armazenamento (USDA65009 X USDA63015M). Com potencial produtivo de 1700 a 2200 kg/ha, seus cones apresentam 12 a 14,5 % de alfa-ácidos, 4 a 6 % de beta-ácidos e 1,7 a 2,3 mL de óleos essenciais/100g. É uma importante variedade de amargor nos EUA e Alemanha, de aroma forte com notas de ervas verdes (não cítricas). Se desenvolve bem em solos mais ácidos, ricos em ácido húmico. Mostra-se resistente ao míldio, oídio e prunus necrotic ring-spot virus. (HAUNOULD *et al.*, 1984; SPÓSITO *et al.*, 2019).

## **1.2 Estruturas secretoras e metabolismo secundário**

As plantas são capazes de produzir grande variedade de secreções. Das mais simples, como as soluções aquosas ricas em sais, aminoácidos e açúcares, às mais complexas, que podem conter centenas de compostos tanto do metabolismo primário (como proteínas, polissacarídeos), quanto do secundário (como terpenos, alcalóides). Em muitos casos esses exsudados são bioativos, que contribuíram e ainda contribuem para o sucesso evolutivo e perpetuação de espécies (ASCENSÃO, 2007).

As secreções podem ser sintetizadas ou apenas armazenadas e eliminadas em células especializadas, que podem ocorrer isoladamente (idioblastos) ou constituírem estruturas diferenciadas (cavidades, ductos, emergências, laticíferos e tricomas) (FAHN, 1979). A morfologia dessas estruturas é altamente diversificada, não havendo relação entre seu formato e a secreção produzida (FAHN 1990; DICKISON, 2000).

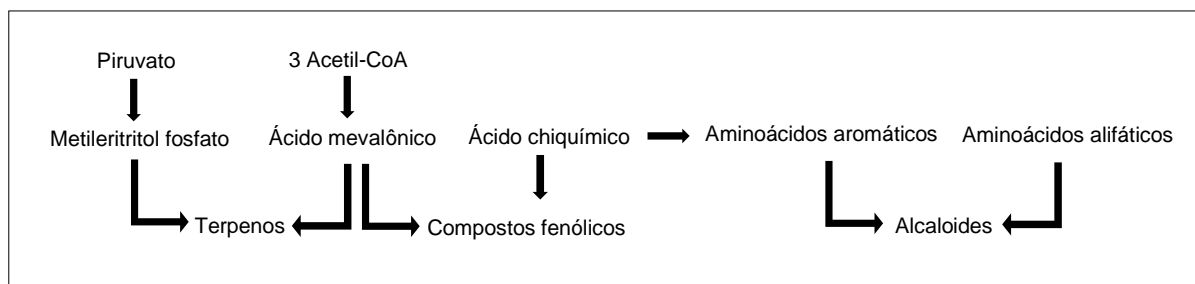
Plantas de uma mesma espécie podem apresentar diferenças anatômicas, fisiológicas e morfológicas de acordo com o habitat que estão inseridas (LARCHER, 2000). Desse modo, os metabólitos produzidos também podem exibir diferentes quantidades e proporções relativas dos componentes das secreções (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Portanto, qualquer prática de manejo no cultivo deve ser ponderada, ao passo que planta está dinamicamente relacionada com o ambiente.

O conjunto de reação químicas que ocorrem no interior das células de todos os organismos vivos é denominado metabolismo. Nas células vegetais o metabolismo se divide em primário e secundário, embora ocorra estreita relação entre as rotas que sintetizam ambos os metabólitos (CASTRO, 2004; PERES, 2004).

O metabolismo primário é definido como conjunto de processos metabólicos que desempenham funções vitais nos vegetais, tais como: fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário têm distribuição universal nas plantas, que compreendem os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila (PERES, 2004).

O metabolismo secundário, ou especializado, gera compostos que não possuem distribuição universal, pois não são necessários e/ou sintetizados por todas as espécies (PERES, 2004). Através da fotossíntese, as plantas sintetizam compostos orgânicos, que são os precursores dos metabólitos especializados (CASTRO, 2004). Esses são classificados de acordo com suas vias biossintéticas em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. E os alcalóides são provenientes de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (PERES, 2004) (Figura 1).

**Figura 1 – Vias de síntese dos metabólitos especializados**



Fonte: Adaptado de Dewick (2001).



Os metabólitos especializados são elementos característicos de certas espécies e podem ser o resultado da adaptação ao ambiente, no que diz respeito a sobrevivência e perpetuação dos indivíduos, uma vez que são fundamentais ao mecanismo de defesa das plantas (CASTRO, 2004; SAMUNI-BLANK *et al.*, 2012). Portanto, estes compostos são normalmente sintetizados de acordo com as necessidades específicas das plantas, sendo dependente das condições ambientais, das interações com outras plantas e da ocorrência de predação (SAVITHRAMMA *et al.*, 2011).

O exsudado encontrado nas inflorescências do lúpulo é conhecido como lupulina, que é estritamente dependente das rotas de síntese dos metabólitos especializados, uma vez que possui em sua composição de forma majoritária: terpenos: linalol, mirceno e  $\alpha$ -humuleno; compostos fenolólicos: humulonas ( $\alpha$ -ácidos) e lupulonas ( $\beta$ -ácidos); e flavonóides: xanthohumol (FARAG *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são sintetizados por diferentes rotas, por isso são um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Suas rotas metabólicas básicas são: rota do ácido malônico e do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2013). Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE *et al.*, 2005). Variam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (BRAVO, 1998), razão pela qual são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas (SHAHIDI; NACZK, 1995).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é decorrente da sua capacidade de agir como interruptor de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI *et al.*, 1992). Este mecanismo de ação presente nas plantas, desempenha importante papel na redução da oxidação, além de conservar a qualidade do alimento. O consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos reduz o risco de desenvolvimento de diversas patologias (RAMARATHNAM *et al.*, 1995). A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido alvo de diversos estudos, atribui-

se ao resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis tal potencial (PIMENTEL *et al.*, 2005).

No lúpulo os compostos fenólicos correspondem em média a 4% da massa seca dos cones, que incluem grande variedade de compostos com distintas características químicas, como, flavonoides, flavan-3-óis, prenilflavonóides, taninos, ácidos fenólicos, estilbenos, entre outros (GOIRIS *et al.*, 2014).

Na fabricação da cerveja os compostos fenólicos do lúpulo juntamente aos do malte, são responsáveis pela atividade antioxidante, prevenindo a ocorrência de processos oxidativos, incrementando também na estabilidade e sabor. De modo geral, os compostos fenólicos de baixa massa molar do lúpulo atuam como antioxidantes, sequestradores de radicais livres, inibidores de lipoxigenases e quelando metais de transição envolvidos em processos oxidativos. Em contrapartida, os compostos de alta massa molar podem formar complexos com as proteínas da bebida, acarretando em instabilidade coloidal com a consequente formação de turbidez e nebulosidade (RONG *et al.*, 2000).

Medicinalmente os compostos fenólicos do lúpulo apresentam grande potencial, que vem sendo cada vez mais explorado. Entre tais compostos, o flavonoide 8-prenylnaringenina é um potente fitoestrógeno utilizado para alívio de sintomas provocados pela menopausa, também como suplemento dietético, além de apresentar ação antidiabética. O xanthohumol que vem sendo estudado como agente quimiopreventivo, pesquisas desenvolvidas na Bélgica, mostraram que o flavonóide prenilado inibe o desenvolvimento do câncer de próstata (SPÓSITO *et al.*, 2019).

### 1.2.2 Óleo essencial

Os óleos essenciais são constituídos por substâncias provenientes de diferentes rotas metabólicas, majoritariamente por monoterpenos e sesquiterpenos, também por fenilpropanóides, ésteres e outros elementos de baixo peso molecular (CASTRO *et al.*, 2004; CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993).

Devido a volatilidade dos seus constituintes são obtidos por destilação, hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor, de uma planta ou de suas partes; ou pelo processo mecânico, denominado expressão (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Os teores de óleos essenciais dos cones secos do *H. lupulus* variam de 0,5 - 3%. Sua composição química é complexa, com cerca de 485 compostos já identificados, pertencentes as classes dos monoterpenos, sesquiterpenos, cetonas, ésteres e aldeídos (EYRES *et al.*, 2007).

A fração de hidrocarbonetos terpenos ocorre em maior escala, podendo corresponder de 50% a 80% do óleo essencial, sendo o mirceno (monoterpeno) composto majoritário com até 60% da constituição do óleo. Os sesquiterpenos cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -farneseno, juntamente ao mirceno são os compostos mais relevantes para o aroma, representando juntos aproximadamente 80% do total dos óleos essenciais, sendo o percentual relativo desses oscilante de acordo com a variedade (ALMAGUER *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2018).

O conteúdo total de óleo essencial assim como sua composição pode variar de acordo com a variedade em questão, com as condições de cultivo, época de colheita (grau de maturação), método de secagem, oxidação aérea, tempo e condições de armazenamento (HOWARD e SLATER, 1957). Bullis e Likens (1962) sugerem que o rendimento também pode ser ligeiramente influenciado pela sazonalidade.

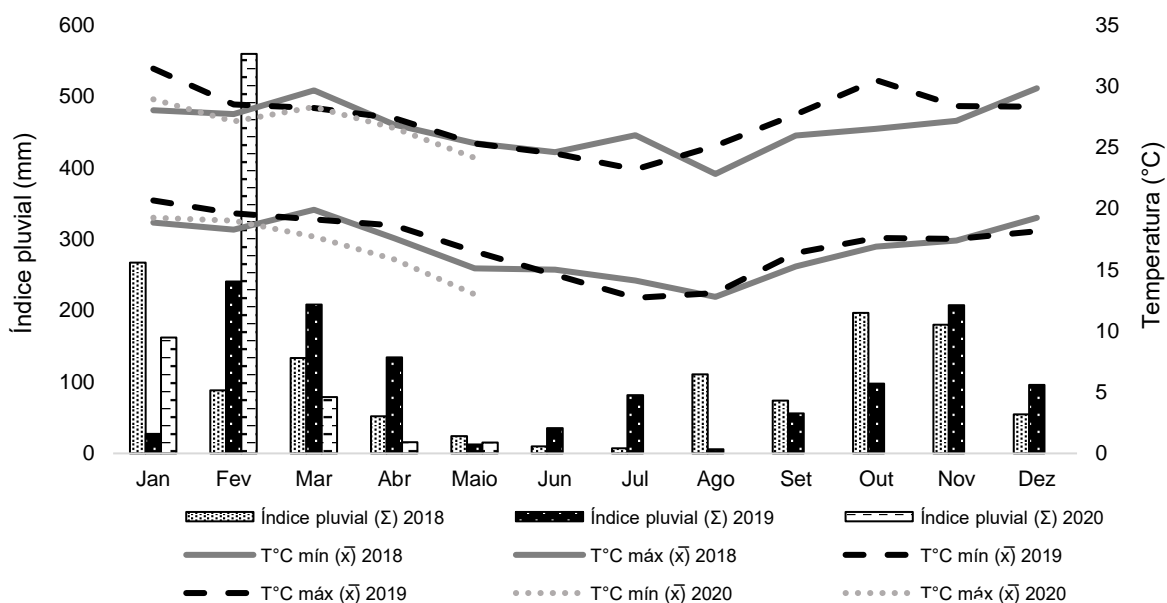
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi implantado no “Pomar Didático”, do Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, *Campus* Botucatu (latitude 22°50' S, longitude 48°26'W; altitude 791 m). Segundo Köppen (1948), clima classificado como subtropical com verão quente (Cfa).

Durante o período das safras (set – fev/mar de 2018-2020), a temperatura média mínima foi de 18,13°C e máxima de 28,34°C, com precipitação pluviométrica de 1120,17 mm (Figura 2). O solo é do tipo Nitossolo Vermelho e suas características químicas foram definidas através de análise de solo.

**Figura 2 – Dados climáticos de 2018, 2019 e janeiro a maio de 2020**



#### 3.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas 2 x 5, sendo fator principal (parcela) sistemas de cultivo: convencional e orgânico; e fator secundário (subparcela) variedades de lúpulo: ‘Cascade’, ‘Columbus’, ‘Chinook’, ‘Hallertau Mittelfrueh’ e ‘Nugget’, com quatro blocos,

e quatro plantas úteis por parcela. As variedades foram selecionadas em função da disponibilidade de mudas comerciais no país e foram adquiridas de viveiro idôneo.

As características avaliadas referem-se a morfologia da parte aérea da planta e análises das estruturas secretoras de cones de lúpulo, teor de óleo essencial e compostos fenólicos, frente as condições estabelecidas.

### **3.3 Caracterização do cultivo**

Para preparo do solo foi realizada escarificação à 40 cm, seguida de aração e gradagem, com posterior sulcagem nas linhas de plantio. A correção e adubação de plantio foram feitas mediante as análises químicas de solo, seguindo recomendação nutricional estabelecida para cultura em literatura internacional. Para correção do solo foi usado calcário e gesso, para adubação de plantio foram aplicados 2 kg/metro linear de esterco bovino curtido no sulco em ambos os sistemas, e no sistema convencional foi adicionado superfosfato triplo, e no sistema orgânico Yoorin master®.

O plantio das mudas foi feito em covas em novembro de 2018, em espaçamento 3,0 m x 1,0 m. Nas entrelinhas do lúpulo foram semeadas espécies de adubação verde: crotalária (*Crotalaria breviflora*) no verão; aveia preta (*Avena strigosa*) e nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) no inverno (Figura 3).

**Figura 3 – Implantação do experimento para cultivo de lúpulo. (A) Gradagem durante o preparo do solo. (B) Correção e adubação. (C) Plantio das mudas em covas. (D) Nabo forrageiro como adubo verde (seta)**



Os fatores de diferenciação entre os sistemas de cultivo dizem respeito a adubação e controle fitossanitário, onde, o cultivo orgânico foi conduzido de acordo com o regulamentado estabelecido pela Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 e o Regulamento Técnico da Instrução Normativa 46, de 06/10/2011, complementada pela IN 17, de 18/06/2014.

*Cultivo convencional:*

As adubações foram realizadas de acordo com a necessidade observada em análises químicas do solo. Na primeira safra a adubação de cobertura nitrogenada foi realizada com nitrato de cálcio e ureia, a adubação potássica com cloreto de potássio, e a de micronutrientes com MIB®. Para controle fitossanitário, diante de infestação de ácaro rajado foram feitas aplicações de Abamex® (Abamectina). Para controle de formigas foi aplicado nos olheiros encontrados Regent® (Fipronil). Para combate de oídio (*Podosphaera macularis*) foi realizada pulverização de Folicur® (Tecobunazol).

Na segunda safra a adubação de cobertura nitrogenada seguiu com nitrato de cálcio e ureia, foi também adicionado cama de frango proveniente de sistema convencional, a adubação potássica com cloreto de potássio, e a de micronutrientes com MIB®. Foi também feita a adubação boratada com ácido bórico, adubação foliar com sulfato de zinco. O controle fitossanitário de ácaro e formiga foi idêntico ao da primeira safra, houve ocorrência de lagartas que foram controladas com Dipel® (*Bacillus thuringiensis*).

#### *Cultivo orgânico:*

As adubações foram realizadas de acordo com a necessidade observada em análises químicas do solo. Na primeira safra para adubação nitrogenada foi utilizado esterco bovino curtido, biomassa de crotalária e torta de mamona, a adubação potássica foi feita com sulfato de potássio. Para controle fitossanitário, devido a ocorrência de ácaro, foram feitas aplicações de calda sulfocálcica, o controle de formigas foi feito com Bioisca®. Para combate de oídio (*P. macularis*) foram realizadas pulverizações com leite cru e calda bordalesa.

Na segunda safra a adubação nitrogenada foi feita com bokashi, composto vegetal, torta de mamona, cama de frango de sistema orgânico, e biomassa de nabo forrageiro, crotalária e guandú. Para adubação potássica foi utilizado sulfato de potássio, para adubação fosfatada Yoorin®, para a boratada ácido bórico, e também foi feita adubação com farinha de osso. Foram feitas pulverizações com biofertilizante SuperMagro e ativação biológica do solo com EM (Microrganismos Eficientes). Para controle fitossanitário preventivo de pragas foram feitas aplicações de *Metharizium* + *Beuaveria bassiana*. O controle curativo de ácaro foi feito com calda sulfocálcica, o de formigas com Bioisca®, e o de lagartas com Dipel® (*Bacillus thuringiensis*).

#### 3.3.1 Tratos culturais

Para condução do lúpulo foram instalados postes de eucalipto com 6 m de altura, em cada poste foram usados como esteio dois mourões em diagonal. Cabos de aço conectaram os postes formando um quadrado, arames foram presos nos cabos e esticados paralelamente as linhas de plantio, com 1 m de distância entre eles. Para fazer a condução das plantas em “V” foram fixadas cordas de sisal do arame até a superfície do solo, sendo puxados dois fios por planta, onde foram selecionados os

ramos mais vigorosos e com a forma hexagonal, (PERAGINE, 2011), para serem conduzidos no sisal no sentido horário.

Foi instalada irrigação por gotejamento automatizada pelo ASI (MEDICI *et al.*, 2010), equipamento que maneja a umidade com base na tensiometria, contando com duas linhas de fita gotejadora para cada linha de plantio, com espaçamento entre os emissores de 0,5 m e 0,4 m entre as fitas.

Nas entrelinhas dos dois sistemas foram cultivadas espécies de adubação verde duas vezes ao ano, que posteriormente eram roçadas no momento de iniciação floral. A biomassa era toda depositada como cobertura mulching nas linhas do sistema orgânico.

O controle de plantas espontâneas foi realizado, quando necessário, de forma mecânica através de roçagem, capina e arranquio.

Na primeira safra foi feito como controle fitossanitário preventivo a limpeza das folhas do baixeiro (até 1m de altura) do lúpulo, em decorrência do aparecimento do oídio (*P. macularis*). Na 2ª safra foi realizada poda rente ao solo, de todos os primeiros brotos emergentes pós dormência, afim de uniformizar a brotação, eliminar ramos ladrões e favorecer a emergência de ramos mais vigorosos. Em ambas safras foram realizadas podas dos ramos não conduzidos nos sisais no momento da condução.

### **3.4 Avaliações**

#### **3.4.1 Descrição morfológica e comprimento de cones**

Para descrição morfológica foram feitos registros fotográficos, e descritas as características da parte aérea da planta juntamente ao respectivo manejo necessário para o cultivo da espécie. Tais características foram hábito de crescimento e aspectos morfológicos de caule, inflorescências e flores.

O comprimento dos cones foi obtido através da média de 30 amostras. Para isso, os cones foram enfileirados rente a uma fita métrica, o resultado total foi então dividido por 30 (Figura 4).



**Figura 4 – Mensuração dos cones**

### 3.4.2 Identificação de tricomas e densidade de tricomas glandulares peltados

A identificação dos tricomas foi realizada por meio de análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para determinação da densidade dos tricomas glandulares peltados foi computada a frequência das estruturas ainda presas, assim como as cicatrizes deixadas após o desprendimento, foram analisadas as brácteas, na região abaxial em dois pontos, e o cálice das flores pistiladas na superfície abaxial, em área de 1,26 mm<sup>2</sup>.

Para tanto foram coletadas quatro amostras de cones da segunda safra, de cada um dos tratamentos no ponto de maturidade fisiológica (fevereiro-março de 2020). O material foi fixado em FNT (formalina neutra tamponada: formaldeído 37% + fosfato de sódio dibásico heptaidrato + fosfato de sódio monobásico monoidratado + água destilada) (Lillie 1965) durante 48 horas, seguidamente desidratado em série etanólica crescente, e conservado em etanol 70%. Posteriormente as amostras foram levadas ao Laboratório da Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da UFMS – *Campus* de Campo Grande - MS para o prosseguimento das análises.

As amostras foram submetidas a desidratação até etanol absoluto, em sequência ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> em aparelho Polaron CPD 7501, fixadas em fita de carbono sobre suporte metálico, e revestidas com fina camada de ouro em equipamento Denton Vacuum Desk III. As micrografias foram feitas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo JEOL-JSM 6380 LV, no Instituto de Física da UFMS.

### 3.4.3 Análise anatômica e histoquímica do tricoma glandular peltado

Para anatomia e histoquímica do tricoma peltado, as amostras de cones passaram pelo mesmo processamento descrito no item anterior de fixação, desidratação até a conservação em etanol 70%. Para prosseguimento das análises segmentos das brácteas junto as flores pistiladas, da região mediana dos cones, foram submetidos à desidratação etanólica em série até 100%. Em seguida foram infiltradas em resina histológica (Historesin, Leica), seccionadas em plano transversal (7  $\mu$ m de espessura), em micrótomo rotativo Leica RM 2145, e montadas as lâminas.

A presença dos compostos químicos é revelada por meio da comparação entre a coloração diferencial produzida pelas secreções após exposição aos diferentes testes histoquímicos em relação à cor natural dos tricomas secretores. Para as análises anatômicas, o material foi corado com azul de toluidina 0,05% em pH 6,5. Para identificação e localização dos principais compostos, as amostras foram submetidas aos reagentes: Schiff/ácido periódico – PAS para reconhecimento de polissacarídeos neutros (JENSEN, 1962), Lugol para amido (JOHANSEN, 1940), Sudan black B para lipídeos totais (PEARSE, 1972), solução de cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), e azul de bromofenol para proteínas (MAZIA *et al.*, 1953). A documentação dos resultados para posteriores avaliações, foram realizadas utilizando máquina fotográfica digital MoticamPro 252B acoplada a microscópio de luz Nikon eclipse Ci.

### 3.4.4 Teor de óleo essencial

Os cones foram colhidos nos períodos de fevereiro-março de 2020, secos em estufa à 35°C, até atingir cerca de 10% de teor umidade. Posteriormente o material foi armazenado em sacos plásticos e mantidos em freezer até o momento da extração.

A extração ocorreu no laboratório de Plantas Medicinais do departamento de Horticultura da UNESP - FCA, Botucatu – SP. Para tanto foram utilizadas 50 gramas de cones de cada parcela, que passaram por trituração em moinho, e em seguida submetidos a hidrodestilação em aparato tipo Clevenger, onde, em balão de 2 L foi inserido o material junto a 1L d'água deionizada, cada ciclo com duração de 90 minutos após levantar fervura. O teor de óleo essencial foi determinado com base na matéria seca ((gramas de óleo/gramas de matéria seca).100).

### 3.4.5 Teor de compostos fenólicos totais

O teor total de compostos fenólicos do extrato etanólico dos cones foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). A composição deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, que são reduzidos pelos extratos a partir da dissociação de um próton, que acarreta na formação do fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, que possuem coloração azul, detectável no comprimento de 760 nm do espectro possibilitando a quantificação dessas substâncias através da espectrofotometria. Assim, ao fim da reação a coloração é tanto mais azul quanto maior a quantidade compostos fenólicos (PIRES *et al.* 2017).

Para isso, cones secos foram triturados em moinho, posteriormente foi pesada cerca de 0,1 grama do material em tubo falcon, adicionado 10 mL de etanol 80%. Em seguida as amostras foram levadas para o banho ultrassônico por quinze minutos e realizada a centrifugação a 3500 rpm durante trinta minutos. Para a realização da análise, uma alíquota de 0,2 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 0,3 mL de etanol 80%, 2,5mL do reagente Folin Ciocalteu, diluído em água 1:10 e 2 mL de carbonato de sódio 4%, logo após os tubos foram deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro BEL 1105 a 760 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, com base em uma curva de calibração do mesmo.

### 3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, através do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Descrição morfológica e comprimento dos cones

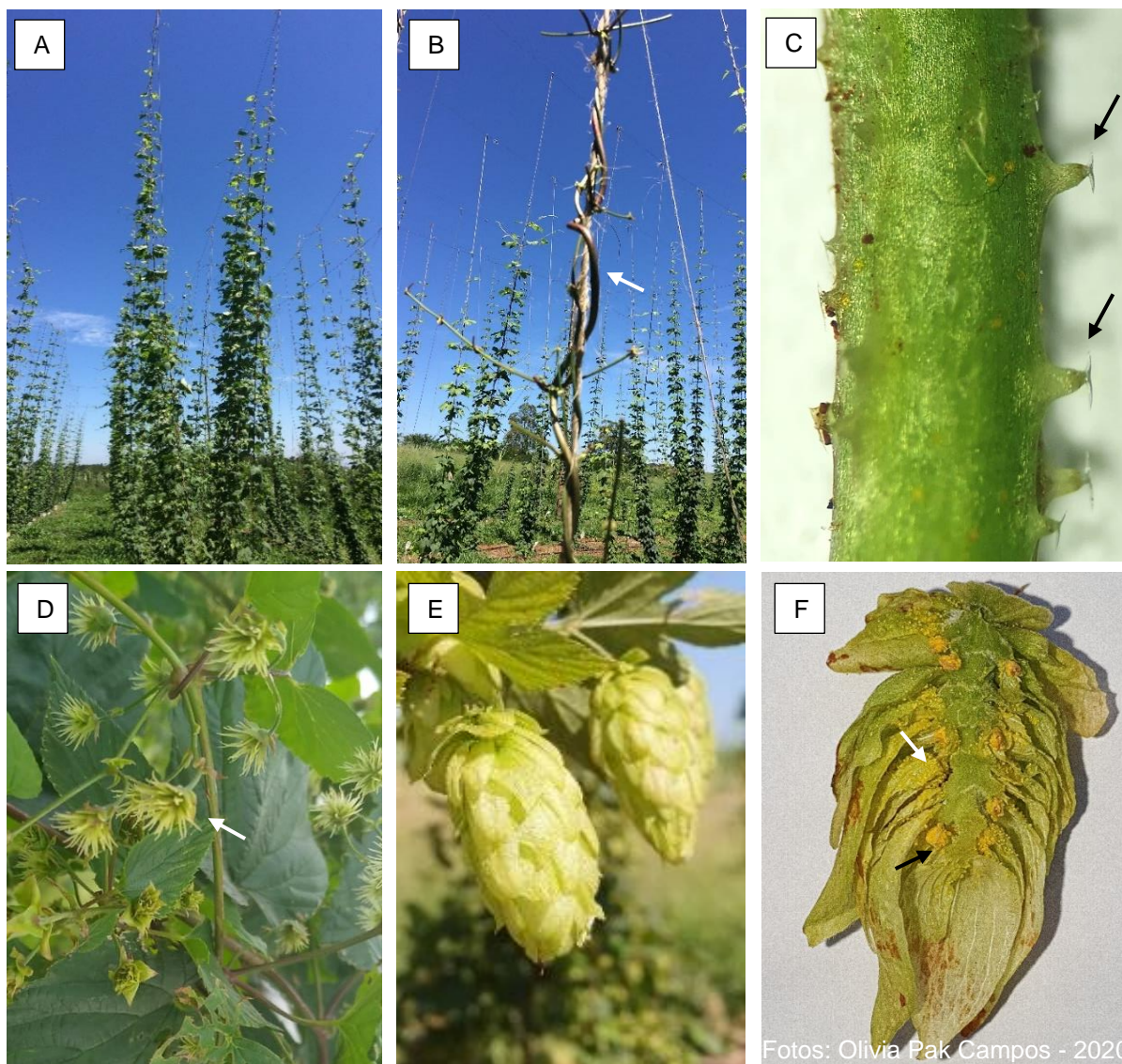
O comportamento morfológico durante a fase vegetativa da espécie foi semelhante em ambos manejos e entre variedades.

O lúpulo é uma planta perene, trepadeira ramificada, dextrogira (rotação no sentido horário ou à direita), sem gavinhas, que se fixa através de pelos aderentes ao sistema de condução (Figura 5 A, B). De crescimento indeterminado, a parte aérea da planta é formada por ramos primários, que crescem verticalmente, e ramos laterais que podem conter apenas folhas ou serem mistos, com folhas e inflorescências (SPÓSITO *et al.*, 2019). Sendo assim o tutoramento das plantas se faz necessário e indispensável, uma vez que está diretamente relacionado com a produtividade.

Por se tratar de uma planta dioica, onde as inflorescências femininas (Figura 5 C, D, E) detêm o interesse comercial, as áreas de cultivo contam apenas com plantas fêmeas, logo, a propagação do lúpulo é feita de forma vegetativa através de estacas herbáceas ou rizomas (SPÓSITO *et al.*, 2019).

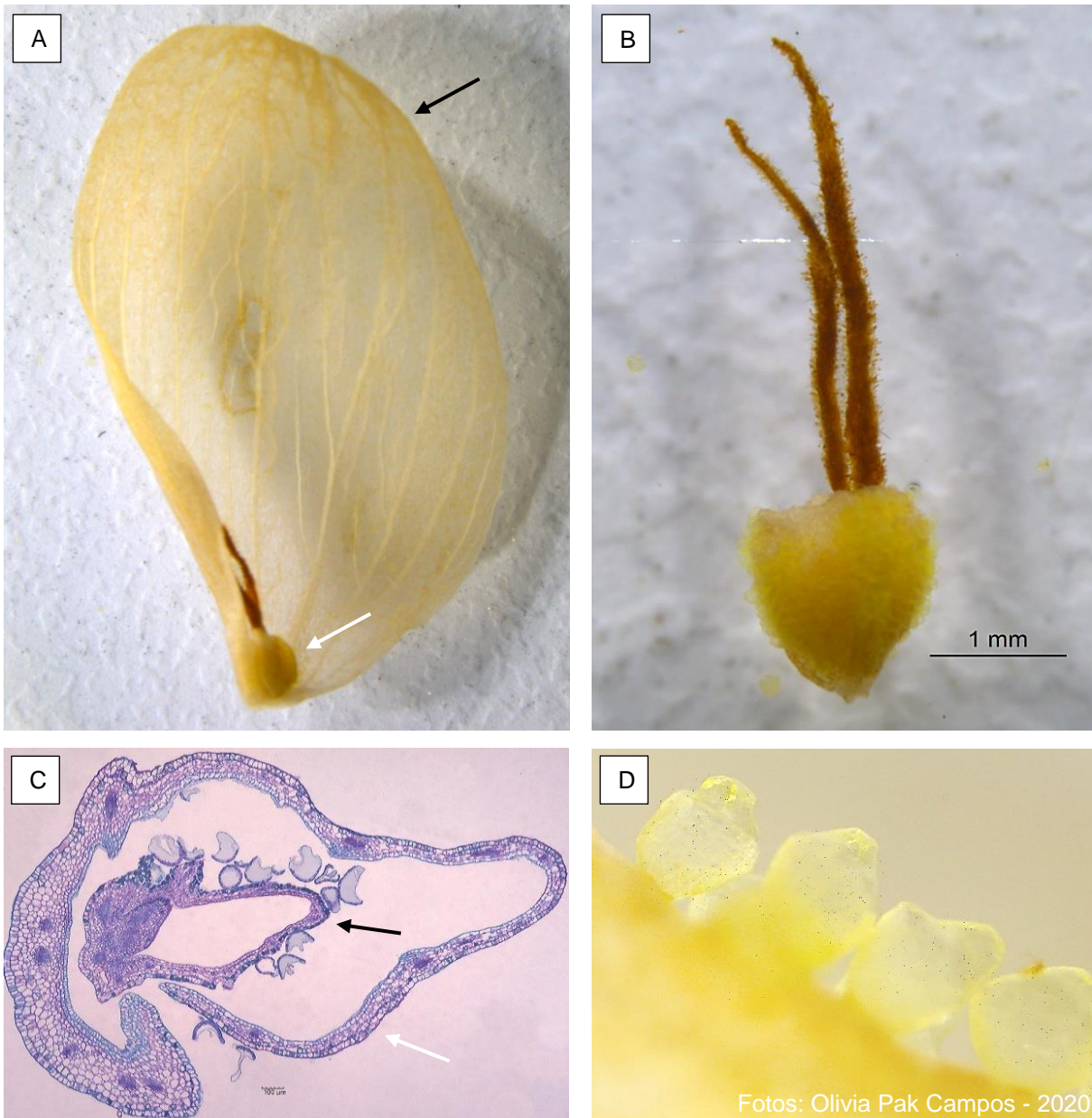
A inflorescência feminina do lúpulo ou cone (Figura 5 D, E), é constituída por uma raquis, na qual estão inseridas as flores e as brácteas (SPÓSITO *et al.*, 2019), nesses órgãos se desenvolvem tricomas glandulares peltados. Esses tricomas são fracamente presos, por um pedúnculo de apenas quatro células, portanto o manuseio durante a colheita e o beneficiamento deve ser feito de forma cuidadosa a fim de evitar perdas (VERZELE e KEUKELEIRE, 1991).

**Figura 5 – Aspecto geral da morfologia de *Humulus lupulus* L.. A: Trepadeira sem gavinhas, ramificada. B: Detalhe dos ramos herbáceos dextrogiros, que se fixam através de pelos aderentes. C: Pelos aderentes (setas). D: Fase de florescimento. E: Cones em fase final de desenvolvimento. F: Secção longitudinal do cone, com destaque para a localização dos tricomas glandulares peltados na bráctea (seta branca) e flor (seta preta)**



As flores pistiladas do lúpulo têm origem nas axilas das brácteas estipulares (Figura 6 A), que podem ocorrer isoladas ou em pares (KUBITZKI, 1993). Observa-se que a flor é revestida por uma grande quantidade de tricoma peltado (Figura 6 B, C, D).

**Figura 6 – Imagens capturadas através de estereomicroscópio (A, B e D) e microscopia de luz (C), detalhando a flor pistilada e tricomas glandulares peltados de *Humulus lupulus* L.. (A) Flor (seta branca) protegida pela bráctea (seta preta). (B) Flor pistilada com cálice recoberto de tricomas glandulares. (C) Secção transversal da base da flor pistilada com sua bráctea; destaque para a maior quantidade de tricomas glandulares aderidos ao cálice (seta preta) em relação a bráctea (seta branca). (D) Tricomas glandulares peltados presentes na superfície abaxial do cálice da flor**



Houve influência significativa dos tratamentos sobre o comprimento médio dos cones de forma isolada (Tabela 1). As médias de comprimento foram superiores no sistema orgânico (3,55 cm). Para variedades, maiores comprimentos foram constatados na ‘Cascade’ e ‘Chinook’, e menor na ‘Hallertau’, com 3,56; 3,37 e 2,78 cm, respectivamente.

Ressalta-se que cada variedade tem suas próprias características morfológicas particulares, incluindo o tamanho do cone, que também é dependente das condições edafoclimáticas (ROBERTS e WILSON, 2006).

**Tabela 1 – Comprimento de cones de variedades de *Humulus lupulus* L., cultivadas em sistemas convencional e orgânico**

Tratamentos	Comprimento de cones (cm)
Sistemas de cultivo	
Convencional	2,97 ± 0,4 b
Orgânico	3,55 ± 0,5 a
<i>p</i> -Value	< 0,05
Variedades	
Cascade	3,37 ± 0,7 a
Chinook	3,56 ± 0,5 a
Columbus Mittelfrueh	3,27 ± 0,4 ab
Hallertau	2,78 ± 0,3 b
Nugget	3,33 ± 0,4 ab
<i>p</i> -Value	< 0,05

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O rendimento de cones por área plantada depende de uma série de fatores que influenciam direta ou indiretamente a produção. Dos quais, o tamanho do cone, afeta diretamente a produtividade (HAUNOLD, *et al.* 1983). O comprimento do cone é um parâmetro utilizado no momento da colheita, nesse período os cones atingem seu tamanho máximo, que está associado ao ponto de maturidade fisiológica (ČEH e ZMRZLAK, 2012).

A medida que os cones se alongam em decorrência do crescimento das brácteas, os tricomas glandulares responsáveis pela síntese e armazenamento dos terpenofenólicos se desenvolvem. Estudos realizados por Kavalier *et al.* (2011), revelam que existe uma relação direta entre o desenvolvimento dos cones e o acúmulo de metabólitos especializados.

Entretanto, cones de tamanho excessivo dificultam o processo de secagem, pois requerem mais tempo, podendo acarretar em perda de qualidade, quando este não é bem planejado (RAUT, *et al.* 2020).

## 4.2 Tipos de tricomas

Em todas as variedades de *H. lupulus* avaliadas foram identificados três tipos de tricomas na inflorescência em ambos sistemas de produção (Figura 7): tricoma tector (Figura 7B), tricoma glandular bulboso (Figura 7E) e tricoma glandular peltado (Figura 7G). A distribuição dos diferentes tipos de tricomas varia de acordo com a região analisada das brácteas e flores pistiladas.

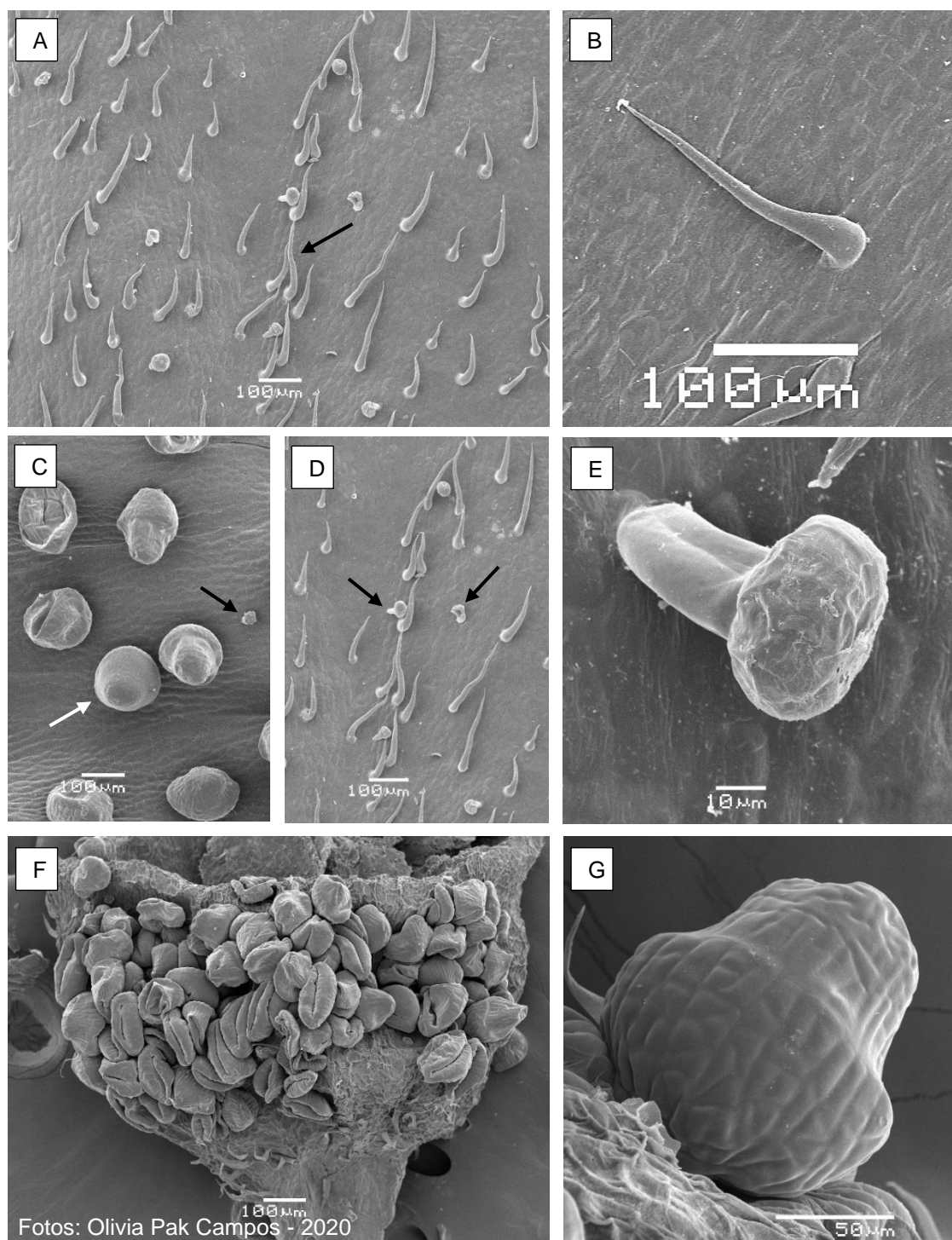
O tricoma tector (Figura 7B), também chamado de não glandular foi constatado em maior quantidade na face abaxial das brácteas (Figura 7A). Tricomas tectores são considerados estruturas de proteção mecânica contra fatores externos, como, herbívoros, patógenos, radiação ultravioleta, calor extremo e perda excessiva de água (VALKAMA *et al.*, 2003). As brácteas também possuem função de proteção (ENDRESS, 1994), sendo assim, as brácteas dotadas de numerosos tricomas tectores funcionam como barreira protetora para as flores pistiladas do lúpulo.

O tricoma glandular bulboso (Figura 7E) é formado por duas células basais, duas células pedunculares e a cabeça glandular é constituída por quatro a oito células (OLIVEIRA e PAIS, 1988). Esse tricoma sintetiza e armazena terpenofenóis e óleo essencial (OLIVEIRA e PAIS, 1988; KAVALIER *et al.*, 2011), entretanto sua contribuição com o montante final é ínfima comparado ao tricoma peltado, uma vez que seu tamanho é diminuto, assim como sua densidade, ocorrendo principalmente nas brácteas (Figura 7 C, D).

O tricoma glandular peltado (Figura 7G) sintetiza e armazena metabólitos especializados, aos quais são atribuídas as propriedades medicinais, bem como são responsáveis por conferir a cerveja aroma e sabor, bioatividades essas que despertam o interesse comercial pela cultura (SRECEC *et al.*, 2011; JELIAZKOVA *et al.*, 2018). Nota-se que tais tricomas ocorrem preferencialmente na região basal da face abaxial das brácteas, e ainda, em maior intensidade na face abaxial do cálice das flores pistiladas (Figura 7F).



**Figura 7 – Eletromicrofotografias de varredura dos tricomas e suas distribuições em brácteas e flores pistiladas de *Humulus lupulus* L.. Região mediana da superfície abaxial da bráctea com intensa presença de tricomas tectores (A). Tricoma tector sob superfície abaxial da bráctea (B). Região basal da bráctea, com presença de tricomas glandulares peltados (seta branca) e glandulares bulbosos (seta preta) (C). Região mediana da bráctea, com tricomas tectores e glandulares bulbosos (setas) (D). Tricoma glandular bulboso sob superfície abaxial da bráctea. (F) Flor pistilada com destaque para os tricomas glandulares peltados em diferentes estágios (E). Tricoma glandular peltado na última fase da morfogênese - maturidade, sob superfície do cálice da flor (G)**



### 4.3 Densidade de tricoma glandular peltado

Foi detectada diferença significativa para densidade de tricomas peltados nas brácteas entre as variedades (Tabela 2, Figura 8). Com destaque para a ‘Cascade’, que apresentou média de 8,19 tricomas. $1,26\text{ mm}^{-2}$ . Em contrapartida, a ‘Hallertau Mittelfrueh’ foi a variedade que apresentou menor densidade de tricomas (3,44 tricomas. $1,26\text{ mm}^{-2}$ ).

**Tabela 2 – Densidade de tricomas glandulares peltados ( $1,26\text{ mm}^2$ ) na superfície abaxial de brácteas de variedades de lúpulo, cultivadas em sistema convencional e orgânico**

Tratamentos	Densidade de tricomas na bráctea
Sistemas de cultivo	
Convencional	6.30 ± 3.1 a
Orgânico	7.00 ± 3.7 a
<i>p</i> -Value	0.37
Variedades	
Cascade	8.19 ± 2.9 a
Chinook	7.44 ± 4.1 ab
Columbus	7.94 ± 3.1 ab
Hallertau Mittelfrueh	3.44 ± 1.8 b
Nugget	6.25 ± 2.8 ab
<i>p</i> -Value	< 0.05

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na coluna diferem significativamente (Teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

Houve interação significativa entre os sistemas de cultivo e variedades para densidade de tricomas peltados no cálice das flores pistiladas (Tabela 3, Figura 9). Em relação aos sistemas, quatro das variedades apresentaram maiores densidades quando cultivadas em manejo orgânico, apenas a ‘Nugget’ apresentou maior densidade em sistema convencional. Entre as variedades, no convencional, a ‘Chinook’ e ‘Nugget’ apresentaram cerca de 33% a mais de tricomas que a ‘Cascade’, no orgânico a ‘Chinook’ e ‘Hallertau’ apresentaram 25% mais tricomas que as demais.

**Tabela 3 – Densidade de tricomas glandulares peltados (1,26 mm<sup>2</sup>) na superfície abaxial do cálice de flores de variedades de lúpulo, cultivadas em sistema convencional e orgânico**

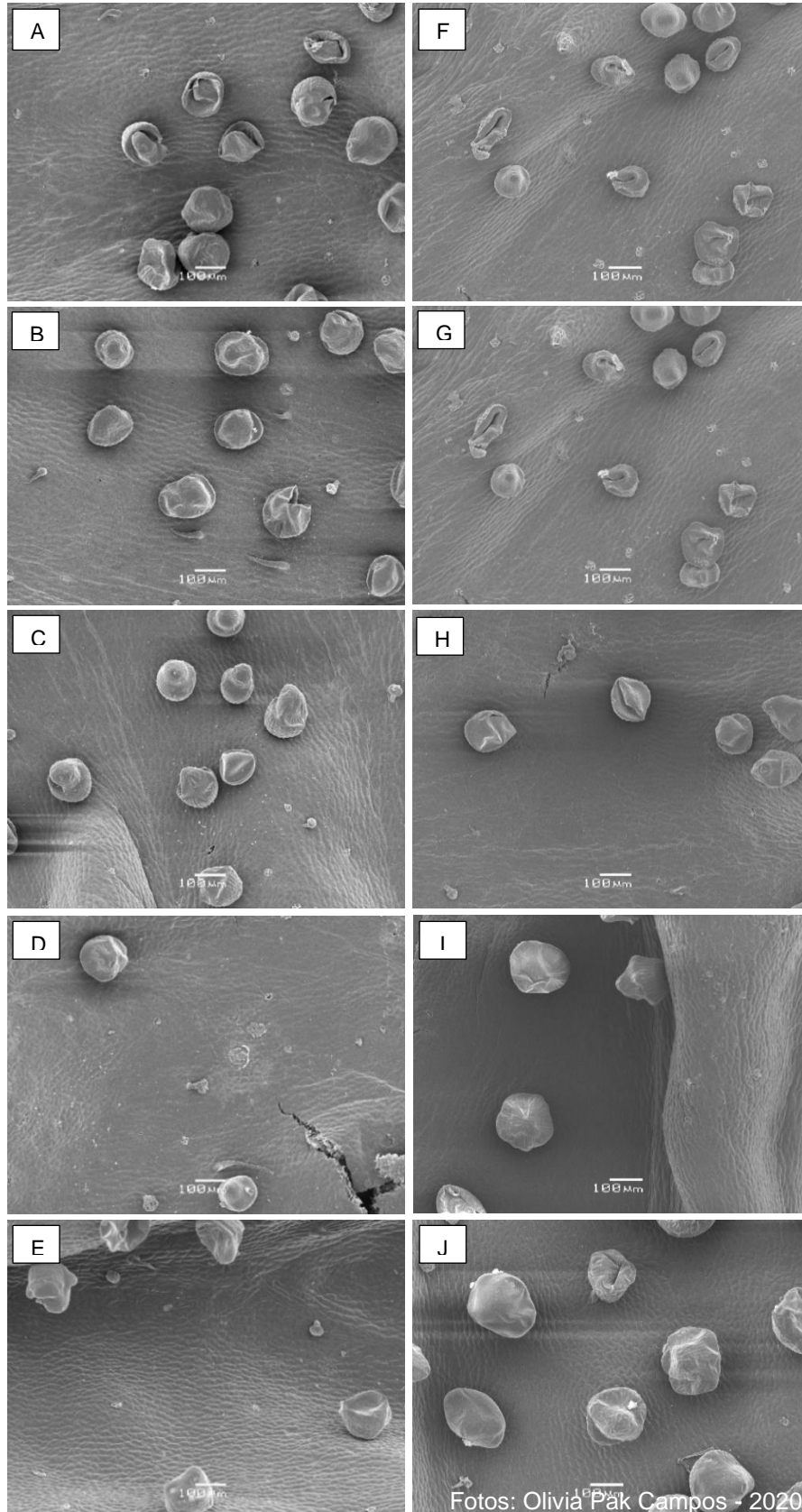
Variedades	Sistemas de cultivo	
	Convencional	Orgânico
Cascade	50.12 ± 7.9 cB	70.75 ± 6.7 bA
Chinook	73.75 ± 2.4 aB	88.12 ± 9.5 aA
Columbus	56.75 ± 10 bcB	72.50 ± 15.2 bA
Hallertau Mittelfrueh	71.37 ± 4.7 abB	92.12 ± 5.8 aA
Nugget	76.37 ± 4.3 aA	59.50 ± 7.7 bB
p-Value	< 0.001	

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente para variedade, médias seguida da mesma letra maiúsculas na linha não diferem estatisticamente para sistema de cultivo, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

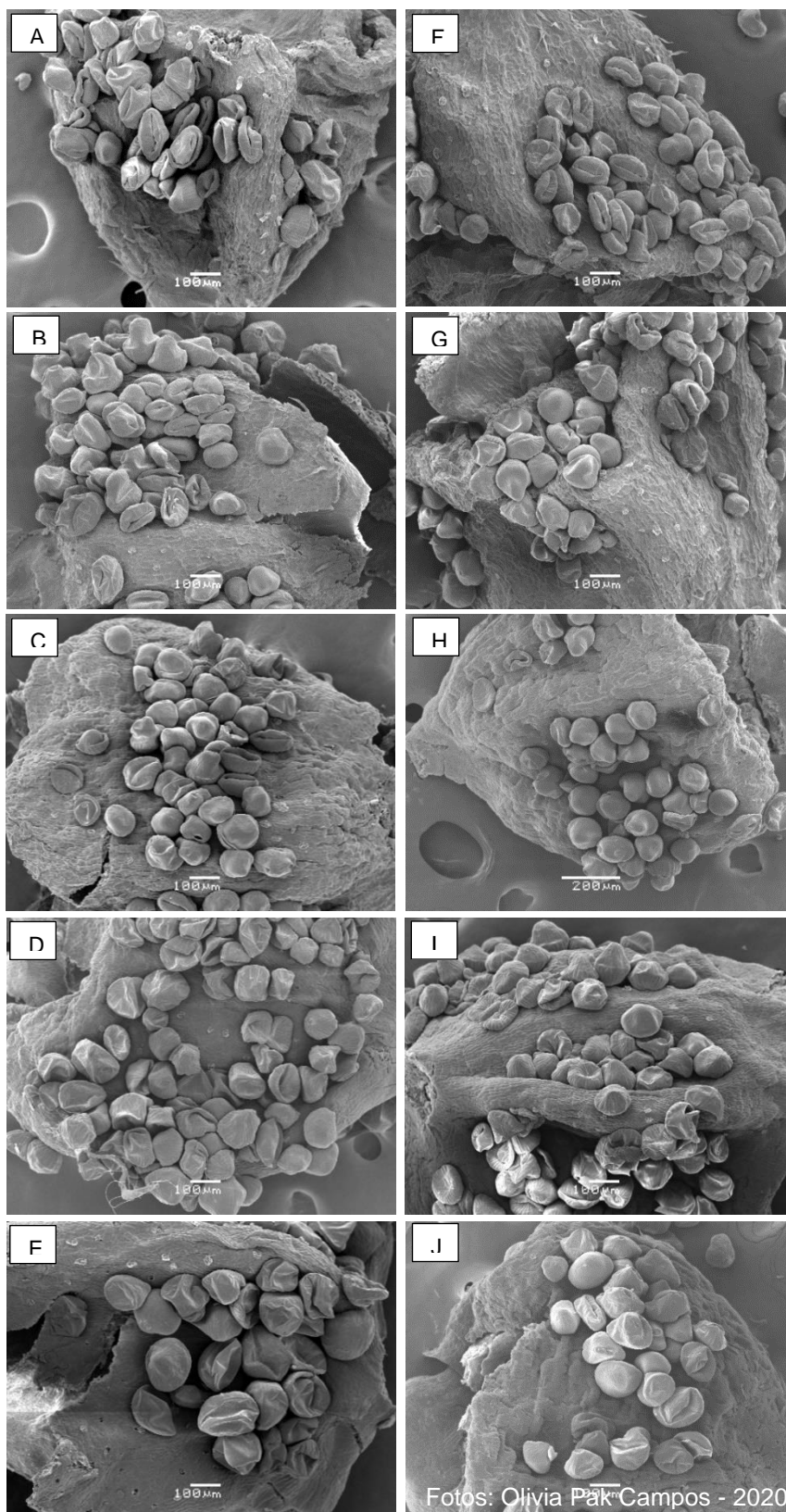
Segundo Neve (1991), existem grandes oscilações entre as diferentes variedades no que diz respeito ao número de tricomas peltados nos cones, essas diferenças são comercialmente de grande relevância, uma vez que, são esses tricomas que contêm os elementos que tem valor para indústria. Patzak *et al.* (2015), ao analisarem diferentes variedades de lúpulo, concluíram que a densidade de tricomas peltados está estreitamente correlacionada com o teor de alfa-ácidos, beta-ácidos e polifenóis.

Sendo assim, variedades que possuem maior densidade de tricomas peltados, e um sistema de cultivo que promova o incremento dessa característica são desejáveis.

**Figura 8 – Densidade de tricomas nas brácteas de variedades de *Humulus lupulus* L. em manejo convencional e orgânico. Cascade convencional (A), Chinook convencional (B), Columbus convencional (C), Hallertau convencional (D), Nugget convencional (E). Cascade orgânico (F), Chinook orgânico (G), Columbus orgânico (H), Hallertau orgânico (I). Nugget orgânico (J)**



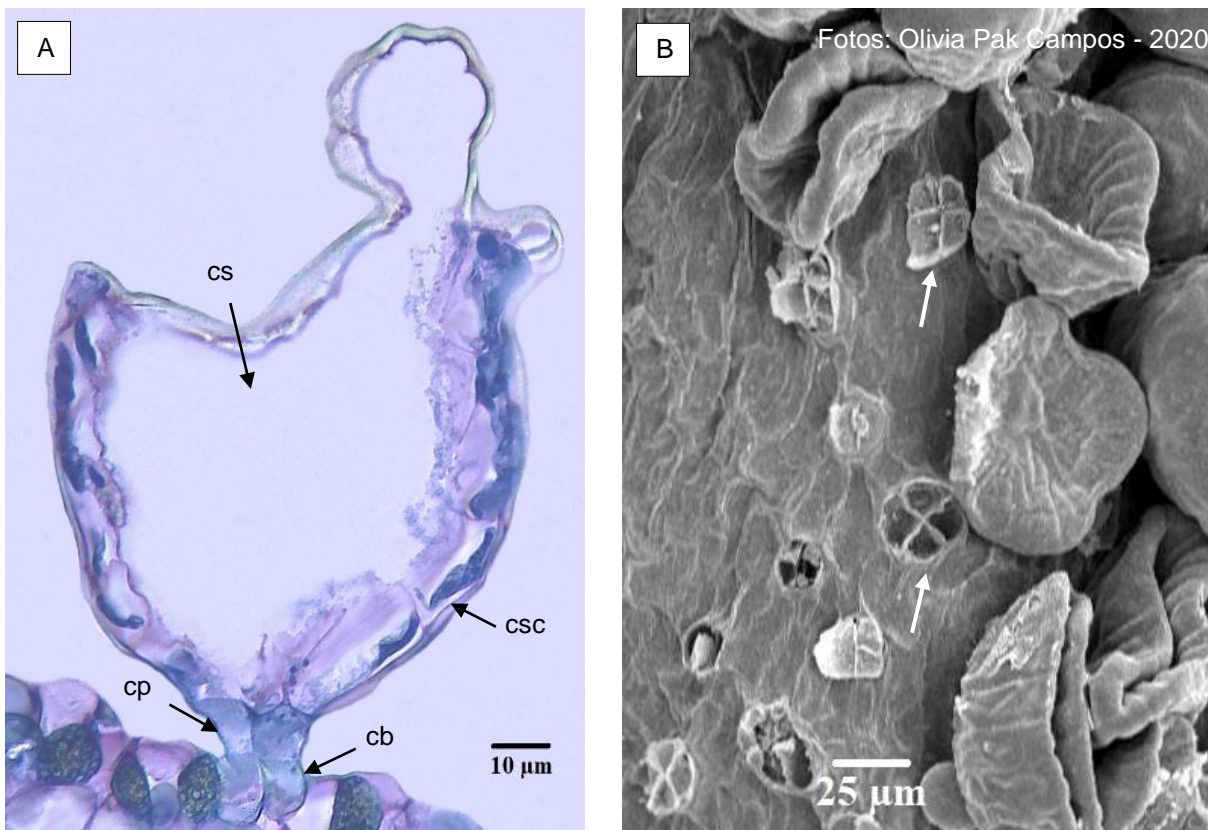
**Figura 9 – Densidade de tricomas no cálice das flores de variedades de *Humulus lupulus* L. em manejo convencional e orgânico. Cascade convencional (A), Chinook convencional (B), Columbus convencional (C), Hallertau convencional (D), Nugget convencional (E). Cascade orgânico (F), Chinook orgânico (G), Columbus orgânico (H), Hallertau orgânico (I). Nugget orgânico (J)**



#### 4.4 Anatomia e histoquímica do tricoma glandular peltado

O tricoma glandular peltado se origina de uma célula protodérmica, e ao final de seu desenvolvimento é constituído por quatro células basais, quatro células pedunculares e uma cabeça glandular composta por um disco de 30 a 72 células secretoras e uma cavidade subcuticular (Figura 10) (OLIVEIRA e PAIS, 1988).

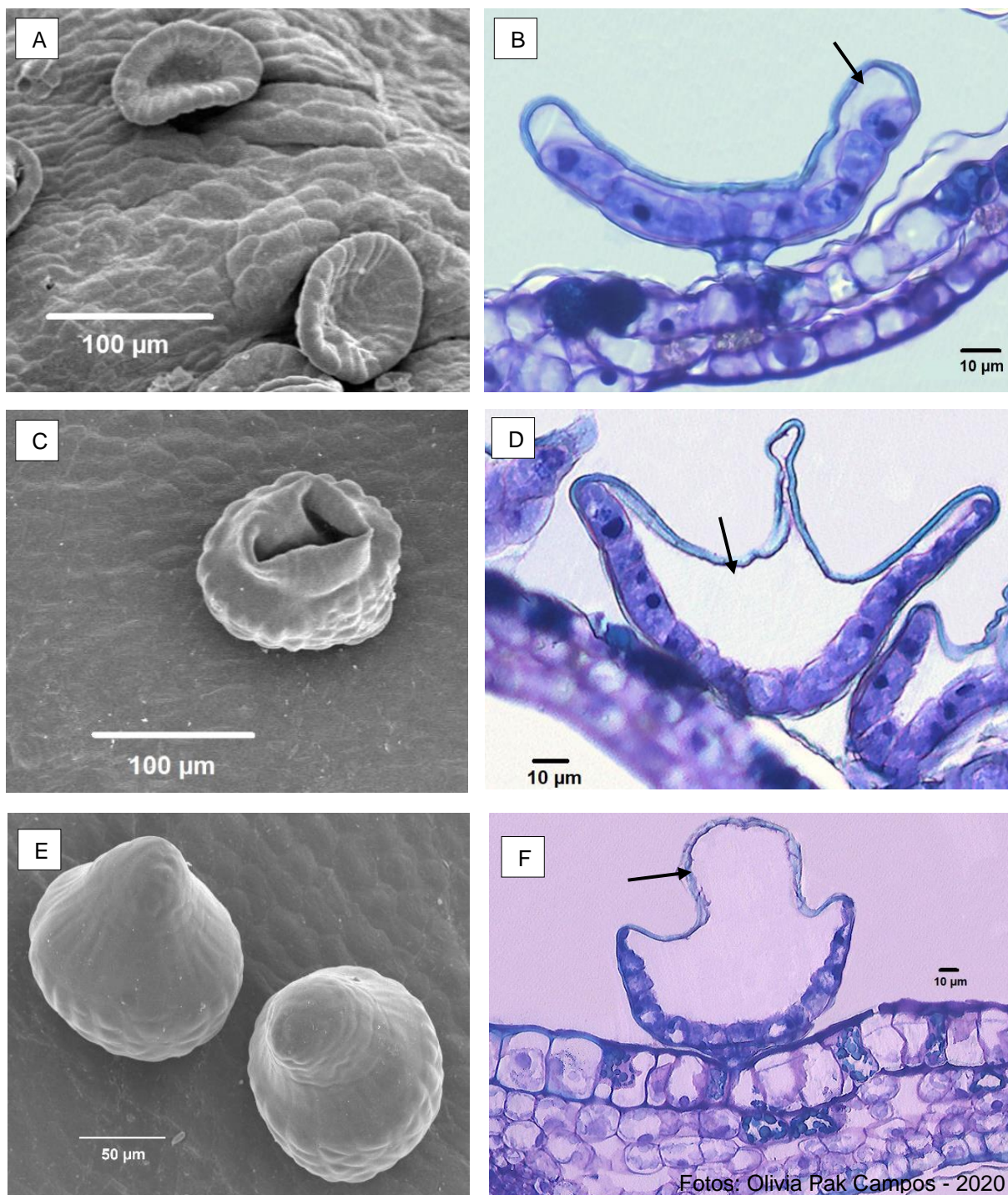
**Figura 10 – Detalhes do tricoma glandular peltado. Secção longitudinal do tricoma; note células basais (cb); células pedunculares (cp); células secretoras (csc); espaço entre as células secretoras e a cutícula que forma a cavidade subcuticular (cs) (A). Eletromicrografia de varredura; note as cicatrizes deixadas após o desprendimento do tricoma peltado (setas), evidenciando as quatro células basais e pedunculares (B)**



Antes da fase secretora possuem formato côncavo, semelhante a uma taça (Figura 11A, B), esses tricomas desenvolvem seu formato pontiagudo conforme ocorre o preenchimento da cavidade subcuticular com secreção (Figura 11 C, D, E, F), que é decorrente do processo da biossíntese e acúmulo da secreção denominada lupulina, que por sua vez, é rica em óleos essenciais e compostos fenólicos. Por este

motivo esses tricomas são também conhecidos como de glândulas de lupulina (SUGIYAMA *et al.*, 2006; NAGEL, 2008).

**Figura 11 – Detalhes do tricoma glandular peltado em microscopia eletrônica de varredura (A, C, E) e microscopia de luz (B, D, F). (A, B) Disco do tricoma completamente formado, em forma de taça, com início do acúmulo de lupulina (seta). (C, D) Estágio de intensa biossíntese e acúmulo de lupulina (seta). (E, F) Tricoma maduro, em formato bicone (seta)**



Todos os reagentes utilizados indicaram resposta positiva em todas as variedades sob o manejo orgânico e convencional (Tabela 4). Foi detectada forte reação com o Sudan black B, indicando acentuado acúmulo de substâncias de natureza lipídica tanto no espaço subcuticular quanto nas células secretoras do tricoma peltado (Figura 12 C).

Nas demais avaliações não foi possível identificar presença dos compostos testados na cavidade subcuticular do tricoma, devido as secções obtidas não permitem tal visualização. Entretanto, foi constatada a presença de polissacarídeos neutros, grãos de amido, substâncias lipofílicas, compostos fenólicos e proteínas nas células que compõem a cabeça do tricoma (Figura 12D, E, F e G).

**Tabela 4 – Resultados dos testes histoquímicos realizados nos tricomas glandulares peltados em flores e brácteas de variedades de *Humulus lupulus* L.**

Reagente	Composto identificado	CAS	CHI	COL	HM	NUG	Fig.
PAS	Polissacarídeos neutros	+	+	+	+	+	12 E
Lugol	Amido	+	+	+	+	+	12 D
Sudan black B	Lipídeos totais	+	+	+	+	+	12 C
Cloreto férrico	Compostos fenólicos totais	+	+	+	+	+	12 F
Azul de bromofenol	Proteínas	+	+	+	+	+	12 G

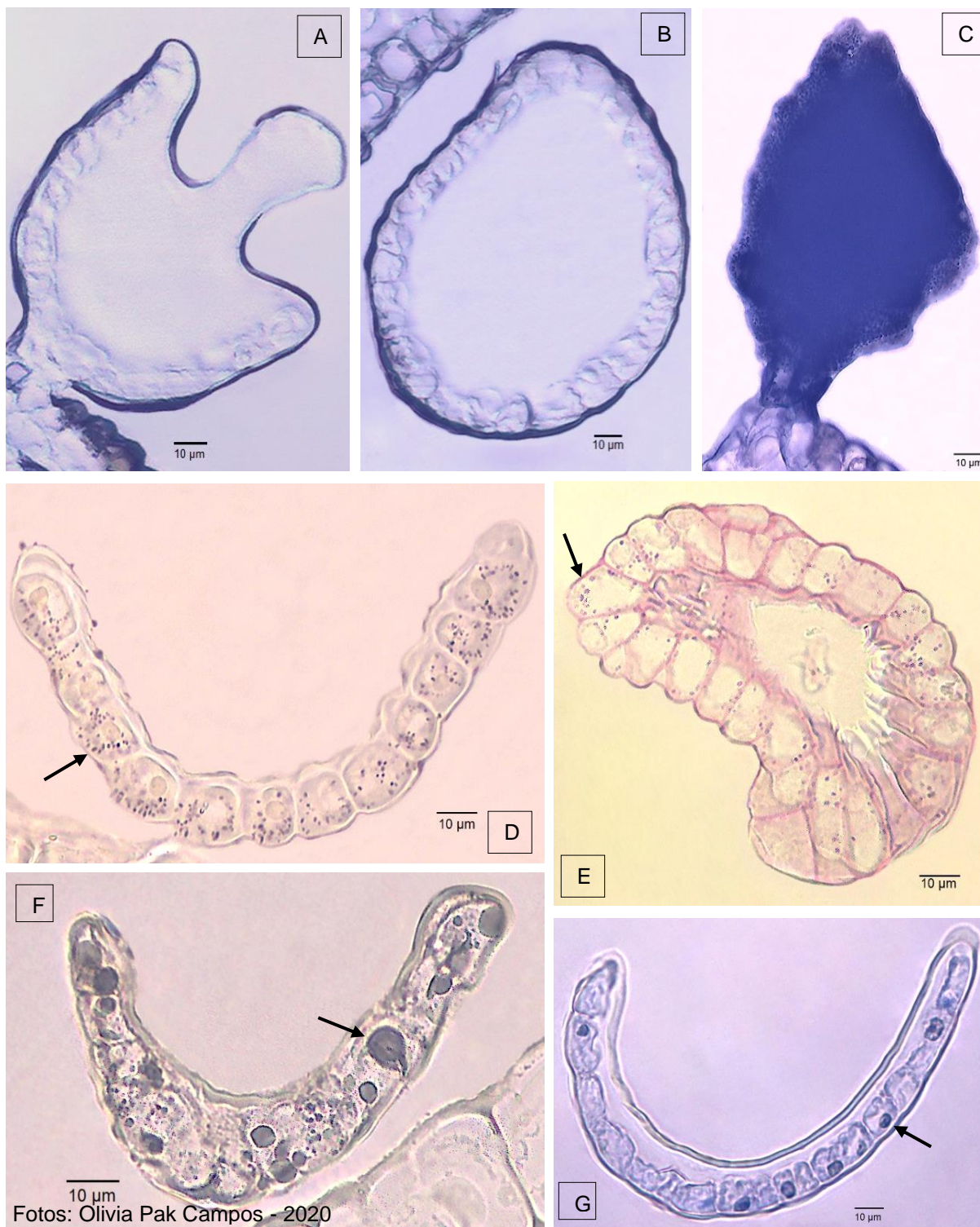
CAS- Cascade; CHI- Chinook; COL- Columbus; HM- Hallertau Mittelfrueh; NUG- Nugget; (+) presença.

Santagostini, *et al.* (2019) ao realizarem estudos histoquímicos dos tricomas peltados do lúpulo, também identificaram intensa resposta ao reagente que identifica lipídeos, no interior da cavidade subcuticular. Oliveira e Pais (1988) também detectaram através dos testes presença de fenóis.

Parte dos resultados estão associados a constituição da estrutura dos tricomas, e não necessariamente com o exsudado secretado, como é o caso dos polissacarídeos (OLIVEIRA e PAIS, 1988), que pode se estender também ao amido e proteínas.



**Figura 12 – Fotomicrografias dos tricomas glandulares peltados de *Humulus lupulus* L. das cinco variedades estudadas: análises histoquímicas. Sem reagente (A, B). Presença de substâncias lipofílicas após reação com Sudan black B (C). Presença de grãos de amido (seta) revelados pelo reagente Lugol (D). Presença de polissacarídeos após reação com PAS (E). Presença de compostos fenólicos (seta), reação com cloreto férrico (F). Presença de proteínas (seta), em reagente azul de bromofenol (G)**



#### 4.5 Teor de óleo essencial e compostos fenólicos totais

Não houve diferença significativa entre os sistemas de produção para teor de óleo essencial. Entretanto, houve entre as variedades, onde no sistema convencional de produção a variedade Nugget apresentou 56% a mais de rendimento que a 'Hallertau Mittelfrueh'. No sistema orgânico a variedade Columbus apresentou 69% a mais de rendimento que a 'Hallertau Mittelfrueh' (Tabela 5).

Para compostos fenólicos não houve diferença significativa entre as variedades tampouco para sistemas de produção (Tabela 5). Entretanto salienta-se que a variedade Hallertau apresentou cerca de 21% menos compostos fenólicos que a média das demais variedades no sistema convencional, e 9% no sistema orgânico.

**Tabela 5 – Teor de óleo essencial (%) e compostos fenólicos (mg equivalente ácido gálico por 100g de massa seca) de cones de variedades de *Humulus lupulus* L. cultivadas em sistemas convencional e orgânico**

Tratamentos	Teor de óleo essencial (%)	Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/100g de massa seca)
Sistemas de cultivo		
Convencional	0,53 ± 0,2 a	3327,17 ± 631,5 a
Orgânico	0,53 ± 0,2 a	2980,70 ± 500,8 a
p-Value	0,96	0,22
Variedades		
Cascade	0,60 ± 0,1 a	3158,54 ± 812,3 a
Chinook	0,58 ± 0,1 a	3244,44 ± 678,4 a
Columbus	0,63 ± 0,2 a	3138,54 ± 489,2 a
Hallertau Mittelfrueh	0,25 ± 0,1 b	2748,40 ± 325,0 a
Nugget	0,59 ± 0,1 a	3479,94 ± 383,2 a
p-Value	< 0,001	0,13

Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para óleo essencial corroboram com a literatura, uma vez que relatam que a variedade Hallertau Mittelfrueh, quando comparado as demais variedades estudadas, apresenta teores de óleo mais baixo (SPÓSITO *et al.*, 2019).

Os teores encontrados, estão dentro da média geral de 0,50 a 3,0% da massa dos cones secos (ALMAGUER *et al.*, 2014), variando de 0,54 a 0,72%, com exceção

da variedade Hallertau Mittelfrueh que apresentou rendimento de 0,22 e 0,28. Considerando que se trata do segundo ano de cultivo, a cultura ainda não se estabeleceu completamente (SALMON e WORDMALD, 1921), ou seja, não expressou seu potencial máximo de produção, justificando os baixos teores encontrados.

Os compostos fenólicos do lúpulo diferentemente do óleo essencial não são sintetizados e armazenados exclusivamente nos tricomas peltados (DURELLO, *et al.* 2019), encontram-se também nas brácteas e no eixo central da inflorescência, com exceção dos prenilflavonóides (xanthohumol, isoxanthohumol e compostos relacionados), que são encontrados majoritariamente nas glândulas de lupulina (ROBERTS e WILSON, 2006). Suas rotas de síntese também se diferenciam, por estes motivos, não apresentam necessariamente o mesmo comportamento estatístico do óleo essencial.

Embora os tratamentos não tenham apresentado influência sobre a quantidade de compostos fenólicos, ressalta-se que, Goiris e colaboradores (2014), ao estudarem os polifenóis e sua relação com a palatabilidade da cerveja, constataram que estes compostos são ativadores de sabor. Sendo assim, variedades que apresentam altos teores de compostos fenólicos são interessantes a indústria cervejeira.

Ainda que os sistemas de produção não tenham influenciado em ambas variáveis é interessante salientar que muitas vezes o cultivo orgânico promove o incremento dos metabólitos especializados, como descrito por Keukeleire *et al.* (2007), que, ao estudarem variedades de lúpulo cultivadas em sistema orgânico e convencional na Bélgica, concluíram que o primeiro pode promover o aumento do teor de metabólitos. E Solarska *et al.* (2015), que, cultivando lúpulo orgânico na Polônia, encontraram significativo aumento de xanthohumol, flavan-3-ols e proantocianidinas, em relação ao cultivado no sistema convencional.

#### **4.6 Correlação de Pearson**

Com base nos testes aplicados (ANOVA, teste t e correlação de Pearson) é possível afirmar que a densidade de tricomas nas brácteas possui alta correlação positiva com teor de óleo essencial ( $r = 0,81$ ), e a densidade de tricomas nas flores possui alta correlação positiva com o teor de compostos fenólicos ( $r = 0,95$ ) (Tabela 6). Essa tendência é explicada pela composição da lupulina secretada pelos tricomas

peltados, que é rica em óleo essencial e compostos fenólicos (LIBERATORE, *et al.*, 2019).

O teor de óleo essencial se correlaciona alta e positivamente com o teor de compostos fenólicos ( $r = 0,92$ ) (Tabela 6). Os óleos essenciais e os fenólicos partilham da mesma rota metabólica do ácido malônico (TAIZ; ZEIGER, 2013), as condições experimentais podem ter beneficiado tal rota, resultando na correlação positiva entre as variáveis.

O comprimento de cone apresentou correlação positiva alta com teor de compostos fenólicos ( $r = 0,63$ ) (Tabela 6). Uma vez que os fenóis são encontrados também nas brácteas e no eixo central da inflorescência do lúpulo (ROBERTS e WILSON, 2006), o tamanho do cone irá influenciar diretamente na quantidade desses compostos.

Sendo assim, se atesta que parâmetros morfológicos e anatômicos possuem alta aplicabilidade em relação a padrões produtivos.

**Tabela 6 – Estimativas das correlações de Pearson entre densidade de tricomas nas flores (DTF), densidade de tricomas nas brácteas (DTB), comprimento de cone (CC), teor de óleo essencial (OE) e teor de compostos fenólicos totais (CF) de variedades de *Humulus lupulus* L. cultivadas em sistemas convencional e orgânico**

	DTF	DTB	CC	OE	CF
DTF	1	0,2388	0,1843	0,1029	0,9496*
DTB		1	0,0029	0,8132*	0,0783
CC			1	0,4835	0,6299*
OE				1	0,9226*
CF					1

\*: Significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.

## 5 CONCLUSÕES

Os sistemas convencional e orgânico de cultivo, e as variedades Cascade, Chinook, Columbus, Hallertau Mittelfrueh e Nugget, não influenciaram o comportamento morfológico das plantas, contudo, o comprimento dos cones foi afetado pelos tratamentos de maneira isolada, onde, o sistema orgânico incrementou o tamanho desses, e as variedades Cascade e Chinook apresentaram médias de comprimento superiores as demais.

Através de eletromicrografias capturadas por MEV foram identificados três tipos de tricomas presentes nos cones, tais quais, tector, glandular bulboso e glandular peltado, não havendo interferência dos tratamentos sobre a ocorrência desses. Ressalta-se a intensa presença de tricomas peltados na superfície abaxial do cálice das flores, sendo assim, com notável contribuição com o montante total de compostos de interesse do lúpulo.

Com relação a densidade de tricomas peltados nas brácteas, os sistemas de cultivo não influíram, entretanto, houve diferença entre variedades, sendo a Cascade a que apresentou maiores valores. Para densidade de tricomas nas flores, houve interação significativa entre os tratamentos, onde, todas as variedades exceto a 'Nugget', apresentaram maiores médias em condução orgânica, destacando-se a 'Chinook' e 'Hallertau Mittelfrueh'.

A anatomia e histoquímica dos tricomas peltados foram iguais em todos os tratamentos, com reação de todos os corantes testados, as respostas variando entre secreção e estruturação dos tricomas.

O teor de óleo essencial não foi afetado pelos sistemas de produção, mas, foi pelas variedades, sendo a 'Hallertau Mittelfrueh' a menos produtiva. Os compostos fenólicos totais não apresentaram diferenciação frente aos tratamentos.

Foram verificadas correlações positivas entre densidade de tricomas nas brácteas com teor de óleo essencial, densidade de tricomas nas flores com teor de compostos fenólicos, teor de óleo essencial com teor de compostos fenólicos, e comprimento de cone com teor de compostos fenólicos. Evidenciando que parâmetros morfoanatômicos possuem alta aplicabilidade em relação a padrões produtivos.

De maneira geral, nas condições estudadas, se destacam a variedade Cascade e Chinook, e o sistema orgânico de produção.



## REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C. *et al.* *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, [S.l.], v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.160>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- ALMEIDA, J. M. **Análise do óleo essencial de variedades de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivadas no Brasil por cromatografia gasosa uni e bidimensional**. 2020. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, 2020.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem Morfo-Anatômica. *In*: FIGUEIREDO, A.C. *et al.* (Eds). **Potencialidade e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático**. 3 ed. Lisboa: Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, p. 19-28, 2007.
- BARTH, H. J. 1950-2005: Hop trade - Events and trends in the hop market in Germany and the USA from 1950 to the present day. **Hopfen Rundschau International**. p. 66-77, 2005.
- BOULTON, C. **Encyclopedia of Brewing**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**; v. 56 n. 11, p. 317-33, 1998.
- BROOKS, S. N. *et al.* Registration of Cascade hop (Registration No. 1). **Crop Science**, v. 12, p. 394, 1972.
- BULLIS, D. E.; LIKENS, S. T. Hop oil... Past and present, **Brew. Dig.** v. 37, p. 54-59, 1962.
- CASTRO, H. G. *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2.ed. Viçosa, MG: Editora da UFV, 2004.
- ČEH B., ZMRZLAK M. Tehnološka zrelost hmelja. *In*: Martin Pavlovič. **HMELJ: od sadike do storžkov**. Žalec: Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, 2012. p. 105-107.
- CEOLA, D. **Aspectos do Lúpulo no Brasil**. Paraná: Beer School, 2020. Disponível em: <http://beerschool.com.br/2020/03/23/aspectos-do-lupulo-no-brasil/>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- CERVBRASIL, Anuário 2016. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130\\_CervBrasilAnuario2016WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016WEB.pdf)>. Acesso em: 13 de Junho. 2019.

- COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**. São Paulo – SP, v. 16, n.3, p. 224 – 228, 1993.
- CUNHA A.R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga** v.14: p. 1-11, 2009.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. John Wiley & Sons, 2001.
- DICKISON, W.C. **Integrative Plant Anatomy**. Academic Press, New York, London, Tokyo, 2000.
- DORES, R. G. R. **Histoquímica de *Dimorphandra mollis* Benth**. 2007. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- DURELLO, D. R. *et al.* Química do Lúpulo. **Química Nova**. v.XY, p. 1-20, 2019.
- ENDRESS, P.K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press, 1994.
- EYRES, G. T.; MARRIOTT, P. J.; DUFOUR, J. P. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.15, 2007.
- FAHN A. **Plant Anatomy**. 4 ed. Oxford: Pergamon Press, 1990.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London/New York/San Francisco: Academic Press, 1979.
- FAO 2015. FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Roma, Itália. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acesso em: 8 ago. 2019.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Data bases**. Agriculture, 2018.
- FARAG, M. A. *et al.* Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *In: Metabolomics*. 8. ed. Berlim: Springer, p. 492 -507, 2012.
- FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations: In comparison to its metabolomic fingerprint. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 4, p. 417 – 421, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais – Óleos essenciais e voláteis. **Revista da Homeopatia**, São Paulo, v. 114, p. 29 -33, 2014.



GIADA, M. de L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 12, n. 4, p. 4-7, dez. 2006.

GOBBO NETO, L., LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, **Química Nova**, v.30, p.374–381, 2007.

GOIRIS, K., *et al.* The flavouring potential of hop polyphenols in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, n. 2, p. 135–142, 2014.

HAUNOLD, A. A., *et al.* Registration of Nugget Hop (Registration No. 13). **Crop Science**. v.24, p.618, 1984.

HAUNOLD, A. *et al.* Registration of Columbia Hop (Registration No. 5). **Crop Science**. v. 16, p. 738-739, 1976.

HAUNOLD, A., *et al.* Yield and Quality Potential of Hop, *Humulus lupulus* L. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, MN, v. 41, n.2, p. 60-63, 1983.

HOWARD, G. A.; SLATER, C. A. Evaluation of hops - VII. Composition of the essential oil of hops. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 63, p. 491-506, 1957.

JELIAZKOVA, E. *et al.* 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**, v. 67, n. 7, p. 871–883, 2018.

JENSEN, W.E. **Botanical histochemistry**: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman and Co, 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940.

KAVALIER, A.R. *et al.* Phytochemical and morphological characterization of hop (*Humulus lupulus* L.) cones over five developmental stages using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, ultrahigh performance liquid chromatography photodiode array detection, and light microscopy techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, n. 9, p. 4783-93, 2011.

KENNY, S. T.; C. E. ZIMMERMANN. Registration of Chinook hop (Registration No. 15). **Crop Science**. v. 26, p. 196-197, 1986.

KEUKELEIRE, J. *et al.* Relevance of organic farming and effect of climatological conditions on the formation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol in hop (*Humulus lupulus* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 61-66, 2007.

KOETTER U., BIENDL M. Hops (*Humulus lupulus*): A review of its historic and medicinal uses. **HerbalGram**, Austin, v. 87, p. 44–57, 2010.

KOHLMANN, H.; KASTNER, A. **Der Hopfen**. Hopfenverlag Wolnzach, Germany. p. 34, 1975.

KONDO, K. Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. **EBC Proceedings**, Dublin, p. 133, 2003.

KRALJ, D. *et al.* Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 97, p. 197–206, 1991.

KUBITZKI, K. Cannabaceae. *In*: KUBITZKI, K., ROHWER, J. G., BITTRICH, V. **The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants – Dicotyledons**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993, p. 204-206.

KUTCHAN, T. M. Ecological and developmental dispatcher: The paradigm of secondary metabolism. **Plant physiology**, v. 125, p. 58, 2001.

LAFONTAINE, S. *et al.* Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. **Food Chemistry**, v. 278, p. 228–239, 2018.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, p. 531, 2000.

LEE, S.J. *et al.* Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, n.1, p. 131-137, 2005.

LIBERATORE, C. M., *et al.* Phenological phases of flowering in hop (*Humulus lupulus* L.) and their correspondence with microsporogenesis and microgametogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 1-6, 2019.

LINDROTH, R. L. *et al.* Seasonal patterns in the phytochemistry of three populus species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.15, p. 681, 1987.

MARCOS, J. A. M. *et al.* **Guia del cultivo del lúpulo**. [Galícia]: :[ s.n.], 2011.

MAZIA, D.; BREWER, P.A.; ALFERT, M. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. **The Biological Bulletin**, v. 104, p. 57-67, 1953.

MEDICI, L.O. *et al.* Automatic controller to water plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.6, p.727-730, 2010.

NAGEL, J. *et al.* EST Analysis of Hop Glandular Trichomes Identifies an O-Methyltransferase That Catalyzes the Biosynthesis of Xanthohumol. **The Plant Cell**, Monona, v. 20, p. 186 – 200, jan. 2008.

NEVE, R. A. **Hops**. 1.ed. Bury St. Edmunds, Suffolk: Chapman and Hall, 1991.

OLIVEIRA, M.M., e PAIS, M.S. Glandular trichomes of *Humulus lupulus* var. Brewer's Gold: Ontogeny and histochemical characterization of the secretion. **Nordic Journal of Botany**. v. 8, p. 349-359, 1988.

- PATZAK, J. *et al.* Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 2, p. 136-145, 2010.
- PATZAK, J. *et al.* Number and size of lupulin glands, glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.), play a key role in contents of bitter acids and polyphenols in hop cone. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n.8, p. 1864–1872, 2015.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 3 ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1972.
- PERAGINE, J. **Growing your own hops, malts, and brewing herbs**. Ocala: Atlantic, 2011.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. p. 1-10.
- PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela; 2005.
- PIRES, J. S. *et al.* **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/324452676\\_Ensaio\\_em\\_microplaca\\_de\\_substancias\\_redutoras\\_pelo\\_metodo\\_do\\_Folin-Ciocalteu\\_para\\_extratos\\_de\\_algas](https://www.researchgate.net/publication/324452676_Ensaio_em_microplaca_de_substancias_redutoras_pelo_metodo_do_Folin-Ciocalteu_para_extratos_de_algas). Acesso em: 10/08/2020
- RAISER, T. C. Commercial aspects of hops, Lecture presented at the 1st Hops Academy, Nürnberg, Germany. 2011.
- RAMARATHNAM, N., *et al.* The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends Food Science Nutr**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.
- RAUT, S., *et al.* Impact of Process Parameters and Bulk Properties on Quality of Dried Hops. **Processes**, Basel, Switzerland, v.8, p.1507, 2020.
- ROBERTS, T. R.; WILSON, R. J.H. Hop analysis. *In*: Priest, F. G. e Stewart, G. G. **Handbook brewing**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2006. p. 181-278.
- RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. **O lúpulo: da cultura ao extrato**: Técnica cultural tradicional. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2015.
- RONG, H. Z. *et al.* Quantitation of 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.), hop products, and beers, by benchtop HPLC-MS using electrospray ionization. **Chromatographia**, v. 51, p. 545-552, 2000.
- SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**. v. 89, p. 105–124, 2003.

SALMON, E. S.; WORMALD, H. A study of the variation in the seedlings of the wild hop (*Humulus lupulus* L.). **Journal of genetics**, Nova Delhi vol. 11, n. 3, p. 241-268, dez. 1921.

SAMUNI-BLANK, M. *et al.* Intraspecific directed deterrence by the mustard oil bomb in a desert plant. **Current Biology**, v. 22, n. 13, p. 1218-1220, 2012.

SANTAGOSTINI, L., *et al.* *Humulus lupulus* L. cv. Cascade grown in Northern Italy: morphological and phytochemical characterization. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology**, v.154, p. 316-325, 2019.

SARNIGHAUSEN, P; SARNIGHAUSEN, V. C. R.; DAL PAI, A. O Lúpulo e a oportunidade do Agronegócio no Brasil. **6ª Jornada de Iniciação Científica da FATEC de Botucatu**, 23 a 27 de outubro de 2017, Botucatu, São Paulo, Brasil.

SAVITHRAMMA, N. *et al.* Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, p. 579-584, 2011.

SHAHIDI, F.; JANITHA P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants, Critical Reviews, **Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995.

Silva, J. B. de A., Pesquisa FAPESP. **Inovações cervejeiras. Investimento em pesquisa e em novas tecnologias melhora a qualidade da cerveja brasileira e os custos de produção**. São Paulo: FAPESP, 2017. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/inovacoes-cervejeiras/#:~:text=Por%20ser%20uma%20cultura%20t%C3%ADpica,cerca%20de%20US%24%2035%20milh%C3%B5es>. Acesso em: 13/06/2019

SINDCERV. **O setor em números**. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/>. Acesso em: 11 maio 2020.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOLARSKA, E. *et al.* The impact of plant protection and fertilization on content of bioactive substances in organic hops. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 14, n. 3, 2015.

SPÓSITO, M.B. *et al.* **A cultura do lúpulo**. Piracicaba: Editora da ESALQ, 2019.

SRECEC, S. *et al.* Morphogenesis, volume and number of hop (*Humulus lupulus* L.) glandular trichomes, and their influence on alpha-acid accumulation in fresh bracts of hop cones. **Acta Botanica Croatica**, Croácia, v. 70, n. 1, p. 1-8, 2011.

SUGIYAMA, R. *et al.* Two distinct phases of glandular trichome development in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Biotechnology Journal**, Japan, v. 23, p. 493–496, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

The Plant List 2013 Version 1.1. Disponível em:  
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Humulus>. Acesso em: 17 jan. 2021.

VALKAMA, E.; *et al.* Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 6, p. 643- 655, 2003.

VENSKUTONIS, P.R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris*) and sage (*Salvia officinalis* L.). **Food Chemistry**, v.59, n.2, p.219-277, 1997.

VERZELE, M.; KEUKELEIRE, D. D. **Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids**, v. 27, Elsevier: Amsterdam. 1991.

YAN, D. D. *et al.* Chemotyping of new hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes using comprehensive two-dimensional gas chromatography with quadrupole accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1536, p. 110– 121, 2018.