



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA**



Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

---

**ADRIANA MARIA LEUZZI DE CASTRO COUTO**

**Patos de Minas - MG**

**2023**

**ADRIANA MARIA LEUZZI DE CASTRO COUTO**

**Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas  
etapas da produção de cerveja**

Dissertação de mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Alimentos  
da Universidade Federal de Uberlândia  
*campus* Patos de Minas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vicelma Luiz  
Cardoso

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Líbia Diniz  
Santos e Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes

**Patos de Minas - MG**

**2023**

## FICHA CATALOGRAFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C871a      Couto, Adriana Maria Leuzzi de Castro, 1981-  
2023      Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas etapas  
da produção de cerveja [recurso eletrônico] / Adriana Maria Leuzzi de  
Castro Couto. - 2023.

Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Coorientadora: Líbia Diniz Santos.

Coorientador: Marcos de Souza Gomes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Campus Patos de Minas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7121>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Tecnologia de alimentos. I. Cardoso, Vicelma Luiz, 1960-,  
(Orient.). II. Santos, Líbia Diniz, 1978-, (Coorient.). III. Gomes, Marcos  
de Souza, 1981-, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia.  
Campus Patos de Minas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. V. Título.

CDU: 664

---

Glória Aparecida  
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, pois todo o meu viver é teu, aos meu marido Silvio, às minhas filhas Melissa e Estela, minha mãe Eliane; pela dedicação e compreensão durante essa e todas as outras caminhadas.

Ao Senhor tudo dai graças...

## AGRADECIMENTOS

A realização deste projeto de pesquisa só foi possível porque Deus trilhou o meu caminho e devido ao apoio recebido de várias pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente e, no qual, sou muito grata a todos.

Ao meu esposo, filhas e mãe, que nunca me deixaram desistir, sempre tornaram os momentos difíceis mais brandos e sempre acreditaram no meu potencial;

Às minhas irmãs, que sempre me incentivaram a trilhar o caminho acadêmico;

Aos meus colegas de trabalho, que sempre contribuíram com a minha busca pelo conhecimento;

Aos meus Professores e professoras, em especial a Dra Vicelma, Dra Líbia e Dr. Marcos, que me acompanharam de perto nessa árdua caminhada contribuindo vigorosamente na elaboração deste trabalho;

Aos técnicos do Laboratório e alunos da Biotecnologia, que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa;

À empresa Aggregare Cervejaria Eireli, que me apoiou dando suporte durante essa difícil tarefa de conciliar trabalho, estudos e família.

E por fim aos meus amigos que sempre me arrancaram sorrisos e estiveram sempre ao meu lado.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*Marthin Luther King*

## ATA DE DEFESA

## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 8/2023 - PPGEA				
Data:	Trinta e um de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	42112EAL011				
Nome do Discente:	Adriana Maria Leuzzi de Castro Couto				
Título do Trabalho:	Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante nas etapas da produção de cerveja				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (Webex) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Dra. Vicelma Luiz Cardoso (Presidente), Dra. Gislaine Fernandes (Membro Externo) e Dr. Neilton Carlos da Silva (Membro UFU).

Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a participação do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da mesma se deu em conformidade às normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra às examinadoras, que passaram a arguir a discente. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos legais, a Banca Examinadora, em sessão reservada, atribuiu o conceito final, considerando a discente:

Aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico integra os requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme será assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Neilton Carlos da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2023, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gislaine Fernandes, Usuário Externo**, em 31/07/2023, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 4686665 e o código CRC 30D678F8.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DA CERVEJA E ALTERNATIVAS PARA MELHORAR SUA BIODISPONIBILIDADE .....</b>	<b>3</b>
1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	3
1.1.1 Ácidos Fenólicos.....	6
1.1.2 Flavonoides .....	8
1.1.3 Taninos.....	10
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS NA CERVEJA .....	11
1.3 MATÉRIAS PRIMAS DA CERVEJA .....	14
1.3.1 Malte de Cevada .....	14
1.3.2 Lúpulo .....	15
1.3.3 Levedura .....	17
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DA CERVEJA .....	18
1.4.1 Malteação da Cevada .....	18
1.4.2 Processo de fabricação da cerveja.....	20
1.5 ALTERNATIVAS PARA MELHORAR A BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA CERVEJA.....	26
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
<b>CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS ETAPAS DA PRODUÇÃO DE CERVEJA .....</b>	<b>41</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	41



2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.2.1	Material .....	41
2.2.2	Metodologia .....	46
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
2.3.1	Etapa 1 .....	52
2.3.2	Etapa 2 .....	59
2.3.3	Teor de Antioxidantes por DPPH e ABTS .....	66
2.4	CONCLUSÕES .....	70
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## RESUMO

Nos últimos anos o interesse nutricional da cerveja tem aumentado por ela ser rica em compostos com propriedades antioxidantes. Estudos sobre antioxidantes, especialmente compostos fenólicos de cerveja e matérias-primas têm sido cada vez mais explorados. Os fenólicos da cerveja são principalmente originados do malte de cevada, seguidos pelo lúpulo, por conta de suas proporções utilizadas na fabricação da cerveja. Porém, a técnica de *dry hopping* e adição de frutas podem ser boas alternativas para aumentar a biodisponibilidade de fenólicos na cerveja, benefícios tanto para a sua estabilidade quanto para a saúde do consumidor, visto que são produtos ricos em compostos bioativos. Considerando o exposto, o objetivo desse estudo foi produzir cervejas com alto teor de fenólicos e alta capacidade antioxidante. O trabalho foi dividido em duas etapas, com o intuito de avaliar primeiramente as matérias-primas (maltes e leveduras) que trariam os melhores resultados de fenólicos e capacidade antioxidante e, posteriormente, melhorar esses resultados com o incremento de morango e lúpulo pela técnica de *dry hopping*. Foi produzida uma cerveja com malte 100% Pilsen de cevada e uma cerveja com maltes Pilsen de cevada e malte de trigo na proporção 50:50. Durante a mosturação as amostragens ocorreram após as rampas de temperatura, desde a arriada (momento em que misturamos o malte moído à água) até o final da fervura. Para os testes com levedura Lager foram utilizadas as temperaturas de 12°C na fermentação, 8°C na maturação e 0°C na clarificação. Para os testes com levedura Ale foram utilizadas as temperaturas de 20°C na fermentação, 12°C na maturação e 0°C na clarificação. Foram realizadas as análises físico-químicas (pH, densidade, açúcares e fenólicos totais) das amostras retiradas durante o processo de mosturação, após a fermentação, maturação e clarificação. O melhor resultado de fenólicos totais obtidos na primeira etapa foi na cerveja produzida com Malte Pilsen de cevada e levedura Lager. Prosseguiu-se então para a segunda etapa adicionando-se o morango e o lúpulo durante a fermentação. As amostragens ocorreram conforme a primeira etapa, mas também retirou-se uma amostra durante a fermentação, antes de adicionar a fruta e de realizar o *dry hopping*. Os melhores resultados obtidos tanto com relação ao teor de fenólicos totais quanto à quantidade total de antioxidantes foram nas cervejas produzidas com malte Pilsen de cevada, levedura de baixa fermentação e adição de morangos e lúpulo por *dry hopping* na etapa de fermentação, comprovando assim o enriquecimento de compostos bioativos que podem aumentar sua vida de prateleira e saudabilidade ao consumidor.

## ABSTRACT

In recent years, the nutritional interest of beer has increased because it is a product rich in compounds with antioxidant properties. Studies on antioxidants, especially phenolic compounds from beer and raw materials, have been increasingly explored. Beer phenolics are mainly derived from barley malt, followed by hops, due to their ratios used in brewing. However, the dry-hopping technique and fruit addition can be good alternatives to increase the bioavailability of phenolics in beer, benefits both for its stability and for the health of the consumer, since they are products rich in bioactive compounds. Considering the above, the objective of this study was to produce beers with a high phenolic content and high antioxidant capacity. The work was divided into two stages, with the aim of evaluating the raw materials (malts and yeasts) that would bring the best results in terms of phenolics and antioxidant capacity and, subsequently, improving these results with the increment of strawberries and hops using the dry hop technique. The beers were produced with 100% Pilsen barley malt and with Pilsen barley malts and wheat malt in a 50:50 ratio. During the beer mashing, the samples were collected after temperature ramps, from the lowering (moment when we added the ground malt to the water) until the end of the boil. For tests with Lager yeast, temperatures of 12 °C were used for fermentation, 8 °C for fermentation and 0 °C for clarification. For the tests with Ale yeast, temperatures of 20 °C were used for fermentation, 12 °C for maturation and 0 °C for clarification. Physical-chemical analyzes (pH, density, sugars and total phenolics) were carried out on samples collected during the mashing process, after fermentation, maturation and clarification. The best result of total phenolics was obtained in the first stage of the beer produced with barley Pilsen malt and Lager yeast. Then, we proceeded to the second stage of the process by adding the strawberry and hops during fermentation. The sampling took place similar to the first stage, but it was also taken during fermentation, before adding the fruit and performing dry hopping. The best results in relation to the total phenolic content and the total amount of antioxidants were obtained in the beers produced with barley Pilsen malt, bottom fermentation yeast and addition of strawberries and hops by dry hopping in the fermentation stage, thus proving the enrichment of bioactive compounds that can increase its shelf life and consumer health.

## INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e sua produção é conhecida desde a antiguidade. Devido à sua capacidade antioxidante, a cerveja é capaz de melhorar a atividade antioxidante plasmática reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. Além disso, os compostos fenólicos presentes na cerveja auxiliam na estabilidade coloidal e no sabor, atuando no aumento da vida útil da bebida e preservando as qualidades sensoriais através da ação dos antioxidantes (ZHAO; ZHAO, 2012).

A estabilidade da cerveja depende de vários fatores, como microbiologia, turbidez, sabor, aroma e estabilidade da espuma. Entre os fatores que influenciam o envelhecimento da cerveja, as reações de oxidação desempenham um papel crucial na deterioração da qualidade da cerveja (BAMFORTH, 1999),

No processo de produção, a adição de lúpulos, cereais e malte leva a um maior teor de compostos antioxidantes naturais na cerveja, principalmente compostos fenólicos, e também produtos da reação de Maillard e sulfatos. Como os principais antioxidantes endógenos da cerveja são os compostos fenólicos advindos das matérias primas, os mesmos são de particular interesse para os cervejeiros por desempenharem um papel fundamental durante o processo de fabricação de cerveja, pois sua manutenção durante o processo produtivo pode retardar ou impedir os processos de oxidação do produto final (ZHAO; ZHAO, 2012).

Os compostos fenólicos mais importantes encontrados em cervejas comerciais são xanthohumol (originado do lúpulo), fenólicos do malte (por exemplo: ácidos fenólicos, flavanóis e flavonóis), compostos aminofenólicos, pró-antocianidinas e taninos (ZHAO et al., 2010). Todos estes compostos são responsáveis por importantes características das cervejas, como cor, aroma, sabor, estabilidade coloidal e capacidade de interagir com proteínas, causando turbidez. No entanto, a concentração fenólica e o perfil das cervejas dependem de vários fatores, não só do estilo da cerveja, mas também da composição das matérias-primas empregadas durante o processo cervejeiro, o que também influencia na composição desses compostos (BORONAT et al., 2020).

O principal ingrediente da cerveja é o malte, principalmente de cevada, que é que o resultado de uma digestão enzimática operada por uma série de amilases produzidas pelo cereal na etapa de germinação (OLANIRAN et al., 2017). Cerca de 80% dos compostos fenólicos da cerveja se originam do malte de cevada e os 20% restantes vêm do lúpulo. Os

compostos fenólicos da cevada existem nas formas livre e ligada e podem ser classificados em fenóis simples, ácidos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides, dependendo de sua estrutura. Os flavonóides são os principais compostos fenólicos livres na cevada, enquanto os compostos fenólicos ligados são ligados aos polímeros da parede celular e são principalmente ácidos fenólicos (DVORAKOVA et al., 2008).

O lúpulo é adicionado na cerveja pra transmitir amargor, aroma e estabilidade microbiológica. Considerando as adições tradicionais de lúpulo no processo de produção da cerveja, onde eles são empregados para atingir o amargor desejado em cervejas, os polifenóis de lúpulo constituem de 20% a 30% do total de polifenóis da cerveja. Os ingredientes mais valiosos do lúpulo são agrupados em resinas duras e macias, polifenóis e óleos essenciais (ALMAGUER et al., 2014). A maioria do lúpulo produzido é processada em *pellets* de lúpulo, extratos de lúpulo e produtos isomerizados e o conteúdo total de polifenóis e sua atividade redutora diminuem durante seu armazenamento (MIKYŠKA; KROFTA, 2012).

Porém, além das características das matérias primas, o processo de fabricação de cerveja e as condições de armazenamento têm impactos profundos nos compostos fenólicos presentes na cerveja final. Assim, este trabalho tem como objetivo trazer uma visão geral sobre os efeitos das etapas de processamento sobre os compostos fenólicos na cerveja visando entender sua formação e evolução durante a fabricação de cerveja. O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro uma revisão sobre os principais compostos fenólicos das matérias primas da cerveja, a estabilidade dos compostos fenólicos durante o processamento da cerveja e as melhores maneiras de enriquecer a cerveja com esses compostos. O segundo contendo um delineamento de experimentos de produção de cervejas, com análises físico-químicas desde o processo produtivo até o produto final (mosturação, fermentação, maturação e clarificação), e a introdução de agentes ricos em compostos bioativos (morangos e lúpulo na fase fria do processo, mais especificamente durante a fermentação) como uma forma de enriquecer a cerveja com compostos fenólicos e consequentemente sua atividade antioxidante.

## **CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DA CERVEJA E ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR SUA BIODISPONIBILIDADE**

### 1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas do mundo, devido ao seu sabor fresco e sua biodisponibilidade. Sua história se estende por mais de 5.000 anos, desde os antigos sumérios, passando pelos fabricantes de cerveja ao longo da lei de pureza alemã de 1516 até a fabricação de cerveja industrial moderna (WANG et al., 2016). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2019) cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjuntos cervejeiros.

Durante o processo de produção, a adição de lúpulos, malte e adjuntos leva a um maior teor de compostos antioxidantes na cerveja e, principalmente compostos fenólicos, produtos da reação de Maillard e Sulfatos (ZHAO et al., 2013). Como Bamforth (1999) afirmou, “existem poucos tópicos mais intimidantes na ciência da cerveja do que os polifenóis: a complexidade é imensa”. É devido a esse alto nível de diversidade que ainda falta conhecimento sobre o destino de algumas substâncias fenólicas desde as matérias-primas até a cerveja final e sua influência na qualidade da cerveja.

As substâncias fenólicas desempenham um papel fundamental na qualidade da cerveja, uma vez que influenciam todos os parâmetros de qualidade da cerveja, como aspecto visual, estabilidade do sabor, cor e clareza do líquido. No entanto, como a importância das substâncias fenólicas para a capacidade de redução e sabor de uma cerveja sempre foi investigada, o interesse dos pesquisadores mudou para a preservação desses compostos desde as matérias-primas até a cerveja final. Os compostos fenólicos derivados do lúpulo e do malte apresentam uma classe de substâncias diversa e complexa que compreende fenóis simples e ácidos fenólicos, bem como taninos condensados e hidrolisáveis (BORONAT et al., 2020)

Os compostos fenólicos presentes na cerveja são originados de grãos de cereais usados para a produção de malte (por exemplo, cevada, milho, arroz, trigo, sorgo, milheto, aveia,

centeio e triticale), lúpulo, bem como de outras matérias-primas não maltadas (FUMI et al., 2011). Segundo Marova et al. (2011), entre os compostos fenólicos que ocorrem na cerveja, os mais importantes são: xanthohumol e prenilflavonóides relacionados (originados do lúpulo), fenólicos de malte (por exemplo, ácidos fenólicos, flavanóis e flavonóis), bem como proantocianidinas, taninos e compostos aminofenólicos.

O potencial reativo dos polifenóis é definido por sua estrutura química básica, padrões de hidroxilação substituição e grau de polimerização. O perfil quantitativo e qualitativo das substâncias fenólicas na cerveja é determinado pela escolha da matéria-prima. Durante o processo de malteação e fermentação, os compostos fenólicos sofrem alterações à medida que são extraídos ou liberados enzimaticamente, são submetidos a reações químicas induzidas por calor ou são precipitados ou adsorvidos a *trub* quente e frio, células de levedura e agentes de estabilização (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018). Por serem potenciais anti ou pró-oxidantes, precursores do sabor, agentes aromatizantes e serem parceiros de interação com outros constituintes da cerveja, eles influenciam nas importantes características de qualidade da cerveja: sabor, cor, estabilidade coloidal e estabilidade do sabor (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

Os compostos fenólicos são compostos com um ou mais anéis aromáticos acoplados a um ou mais grupos hidroxila. Eles fazem parte de metabólitos secundários encontrados principalmente em espécies de plantas com enorme diversidade estrutural. Eles podem existir como glicosídeos ou agliconas; matriz ou compostos de ligação livre (SOCHA et al., 2017); e compreendendo principalmente estruturas polimerizadas ou monoméricas. As plantas podem sintetizar vários compostos orgânicos chamados metabólitos secundários durante os processos metabólicos normais ou em relação a certas condições ambientais, incluindo feridas, temperatura, radiação ultravioleta, infecção e outros (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021; CHEYNIER, 2012; TIAGO et al., 2017). Esses metabólitos são agrupados em relação à ocorrência de anéis fenólicos em suas estruturas e nas estruturas que mantêm o anel no lugar. Eles também desempenham uma variedade de funções para as plantas, incluindo a defesa contra herbívoros e patógenos, absorver luz, atraindo polinizadores, reduzindo o crescimento de plantas, e provendo a relação simbiótica com fixação de nitrogênio pelas bactérias (DAS; GOUD; DAS, 2019).

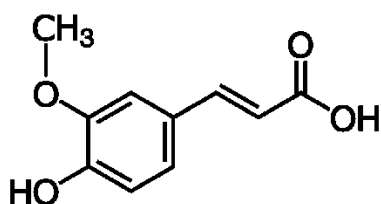
Os compostos fenólicos ocorrem como derivados funcionais, como ésteres metílicos e glicosídeos. Apesar de sua diversidade estrutural, eles são referidos como polifenóis. Eles

são encontrados na sua forma conjugada com poli e monossacarídeos, ligados a um ou mais compostos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

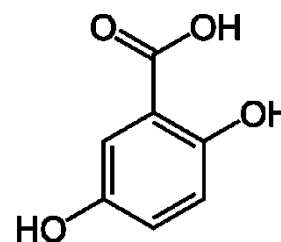
Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem um anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxil, e variam de moléculas fenólicas simples a compostos altamente polimerizados (BRAVO, 1998). Alguns exemplos de estruturas de fenólicas são apresentadas na Figura 1.1.

Segundo Harborne (1989) embora essa diversidade estrutural resulte numa ampla gama de compostos fenólicos que ocorrem na natureza, os compostos fenólicos podem ser categorizados em várias classes, e na Tabela 1.1 apresentamos algumas delas e sua ocorrência em bebidas.

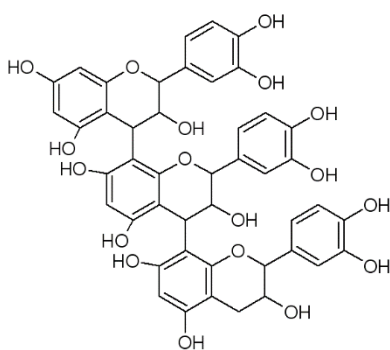
Figura 1.1 - Estruturas fenólicas



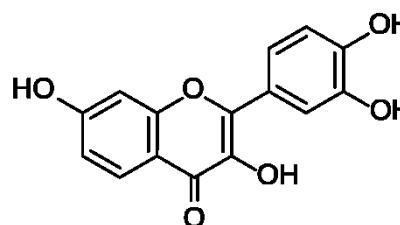
Ácido hidroxicinâmico (ácido ferúlico)



Ácido hidroxibenzóico (ácido gálico)



Tanino hidrolisado (proantocianidina)



Flavonoide (flavonol)

Fonte: elaborado pelo autor (2022)



Tabela 1.1 - Classe de fenóis, exemplos e bebidas onde são encontrados

<b>Classe</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Bebidas</b>	<b>Referência</b>
Ácidos fenólicos	Ácido gálico	Cerveja	(MOURA-NUNES et al., 2016)
Ácidos Fenilacéticos	p-hidroxifenilacético	Cerveja	(MOURA-NUNES et al., 2016)
Ácidos Hidroxibenzóicos	Ácido vanílico	Cerveja Cachaça	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MENDES et al., 2011)
	Ácido Siringico	Cerveja Cachaça	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MENDES et al., 2011)
Ácidos Hidroxicinâmicos	Ácido cafeico	Cerveja Vinho	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MITIĆ et al., 2014)
	Ácido Ferúlico	Cerveja Vinho	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MITIĆ et al., 2014)
Estilbenos	Resveratrol	Vinho	(MITIĆ et al., 2014)
Flavanols	Catequina	Cerveja Vinho	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MITIĆ et al., 2014)
	Epicatequina	Cerveja Vinho	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) (MITIĆ et al., 2014)
Flavonóides	Xantohumol	Cerveja	(DVORAKOVA et al., 2008)
Isoflavonóides	Iso-xantohumol	Cerveja	(DVORAKOVA et al., 2008)

De maneira geral, os principais compostos fenólicos identificados na cerveja incluem ácidos fenólicos, flavonóides, e taninos (ZHAO et al., 2010), conforme ilustrado na Figura 1.2.

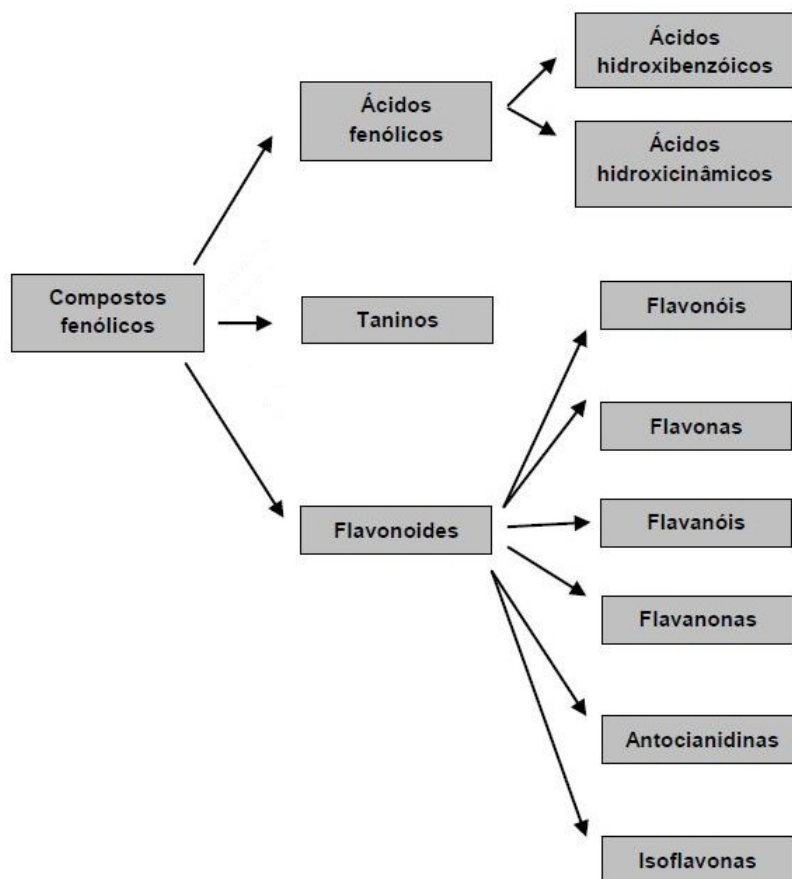
### 1.1.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos têm sido amplamente estudados nas pesquisas da ciência alimentar devido ao seu efeito antioxidante. Como já dito por Das et al. (2019), eles são uma subclasse dos compostos fenólicos. Geralmente ocorrem em plantas como ésteres ou glicosídeos conjugados com outros compostos naturais como ácidos graxos, flavonoides, esteróis e glucosídeos. São considerados fenóis que contém um anel fenólico e pelo menos um ácido carboxílico orgânico como grupo funcional. Segundo Heleno et al. (2015) eles

podem ser categorizados em três grupos como C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>–C<sub>2</sub> e C<sub>6</sub>–C<sub>1</sub> baseados na unidade de carbono da cadeia lateral ligado ao anel fenólico.

Como relatado por Das et al. (2019), os ácidos fenólicos se dividem em ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos. É possível ver suas diferenças estruturais na Figura 2.3. A estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos é C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. As hidroxilações e metilação do anel aromático em ácidos hidroxibenzóicos são responsáveis pelas variações nas estruturas individuais. Existem oito ácidos fenólicos comumente classificados como ácidos hidroxibenzóicos, tais como p-hidroxibenzóico, vanílico, seringico, gálico, verátrico, ácido gentísico, benzóico e protocatecuico (HELENO et al., 2015).

Figura 1.2 - Principais classes de compostos fenólicos encontrados na cerveja

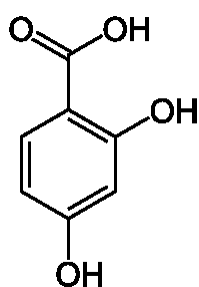


Fonte: elaborado pelo autor (2022)

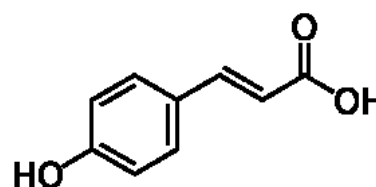
Os ácidos hidroxibenzóicos estão presentes principalmente na forma solúvel conjugada com açúcares ou ácidos orgânicos, bem como na forma ligada a frações da parede celular (LENTZ, 2018).

Já os ácidos hidroxicinâmicos são um grupo de compostos extremamente abundante nos alimentos, e presume-se que cerca de um terço dos compostos fenólicos em nossa dieta são os ácidos hidroxicinâmicos. Dentro desse grupo inclui-se sete ácidos fenólicos, como ferúlico, caféico, sinápico, ácido cinâmico, ácido o-cumárico, ácido m-cumárico e ácido p-cumárico. Os ácidos hidroxicinâmicos têm uma estrutura química simples que consiste em uma estrutura fenilpropanóide C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, e são o subgrupo principal de ácidos fenólicos com ampla distribuição nas plantas. São encontrados principalmente no café, folhas de chá, frutas, vegetais e grãos inteiros (LENTZ, 2018). A Figura 1.3 mostra a estrutura dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico.

Figura 1.3 – Estrutura básica dos ácidos fenólicos



Ácido hidroxibenzóico



Ácido hidroxicinâmico

### 1.1.2 Flavonoides

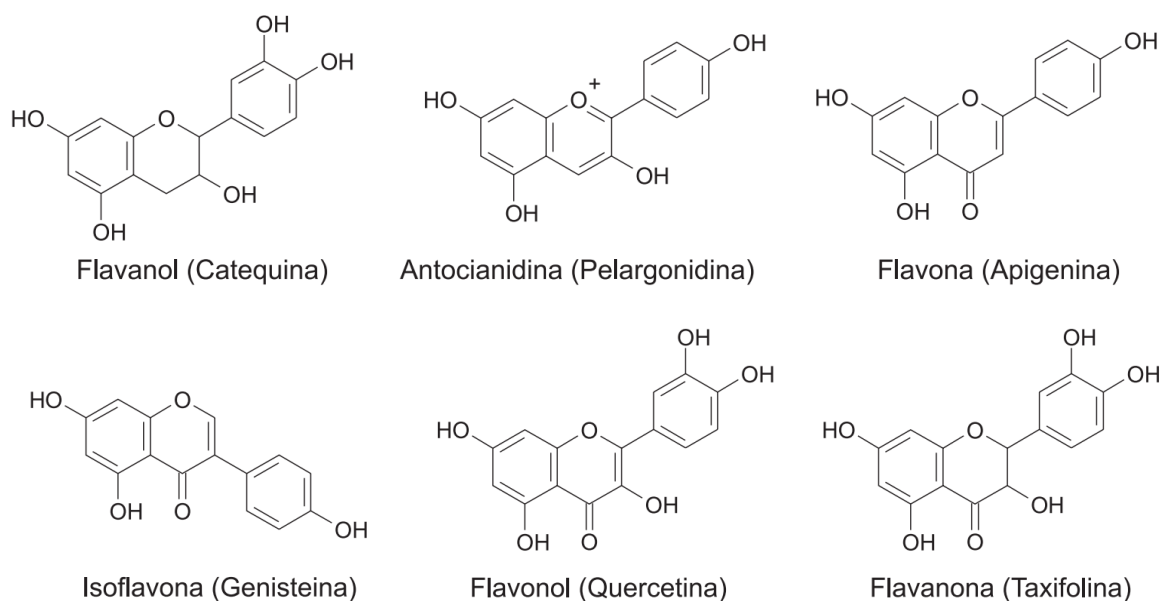
A palavra flavonoide se origina da palavra latina "*flavus*", e significa amarelo. Portanto, inicialmente, apenas o grupo de compostos com um núcleo de flavona com coloração amarela era considerado um flavonoide. Hoje em dia, o conceito de flavonoide é usado em uma perspectiva mais ampla e inclui compostos incolores (flavan-3-ol) a coloridos (flavanona), que ocorrem comumente em plantas. Os flavonoides são referidos como vitamina P porque tem a capacidade de diminuir a fragilidade capilar e a permeabilidade em humanos. Alguns flavonoides têm atividade poupadora de vitamina C, portanto, flavonoides também são conhecidos como vitamina C2. A biossíntese dos flavonoides é parte da via do fenilpropanóide que, além dos flavonoides, leva à formação de uma ampla gama de compostos fenólicos (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Uma função importante dos flavonóides é como agente corante de plantas. Eles também têm algumas funções importantes, como defender as plantas de radiações

ultravioletas destrutivas do sol, para inibir o ataque de parasitas, para controlar certas atividades enzimáticas e atuar como substâncias sinalizadoras. Também são responsáveis por dar sabor a vários produtos vegetais que são usados para consumo humano. Os flavonóides constituem um grupo de componentes vegetais naturais com base na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> no núcleo flavan. Quimicamente flavonóides são baseados em um esqueleto de 15 carbonos que consiste em dois anéis de benzeno ligados por meio de um anel pirano heterocíclico (TIAGO et al., 2017).

Na Figura 1.4 pode-se observar a estrutura química dos flavonoides. Esses são responsáveis pelas várias propriedades químicas e bioquímicas. As principais classes de flavonóides presentes nas frutas e bagas são os flavanóis, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (KUMAR; PANDEY, 2013).

Figura 1.4 - Estrutura geral e exemplos de flavonoides.



Fonte: CERQUEIRA (2007)

Na natureza, os flavonóides estão disponíveis como agliconas, glicosídeos e derivados metilados. O aglicona é a estrutura básica dos flavonóides. O anel de seis membros condensado com um anel de benzeno é um  $\alpha$ -pirona, como flavonóis e flavanonas ou seu dihidroderivativo como flavonóis e flavanonas. Por substituinte benzenoide, a classe

flavonóide se divide em flavonóides (2 posições) e isoflavonóides (3 posições). Flavonóis e flavanonas diferem um do outro por um grupo hidroxila na posição 3 e uma ligação dupla C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002)

### 1.1.3 Taninos

Os taninos são polifenóis solúveis em água encontrados principalmente em frutas, sementes, flores e cascas. Seu peso molecular varia entre 500 e 3000 Daltons e sua estrutura polifenólica é composta por 12–16 grupos fenólicos e 5–7 anéis aromáticos por 1000 unidades de peso. Esses agentes ativos têm as vantagens de serem renováveis, ecologicamente corretos e seguros de usar, além de apresentarem uma interessante capacidade antioxidante e antimicrobiana (CANO et al., 2021),

Segundo Leonard et al. (2021) a definição de taninos pode ser feita com base nas suas estruturas moleculares e sua origem e papel na vida vegetal. Ele cita que os taninos são metabólitos polifenólicos secundários da maioria das plantas, e são ésteres de galato e seus derivados, onde porções de galato ou seus derivados estão ligados a uma variedade de núcleos de polioliol, catequina e triterpenóide - galotaninos, elagitaninos e taninos complexos (taninos hidrolisáveis), ou eles são proantocianidinas oligoméricas e poliméricas que podem possuir diferentes padrões de acoplamento e substituição de interflavanil (taninos condensados).

Galotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples, contendo um resíduo polifenólico e um polioliol. Embora uma grande variedade de resíduos de polioliol serem possíveis, a maioria dos galotaninos isolados de plantas contém um resíduo de polioliol derivado de D-glicose. As funções hidroxil dos resíduos de polioliol podem ser parcialmente ou totalmente substituído com unidades de galato. No caso de substituição parcial com resíduos de galato os grupos hidroxilo restantes podem ser não-substituídos ou substituídos por vários outros resíduos. A maioria dos galotaninos substituídos por uma unidade de galato no centro anomérico de sua unidade D-glucosil tem a configuração  $\beta$  no centro anomérico. Os elagitaninos são os taninos encontrados em maior quantidade nos vegetais. São taninos hidrolisáveis compostos por um núcleo de polioliol, principalmente glicose, que é esterificado com ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e, em alguns casos, ácido gálico (ENOMOTO, 2021).

Os taninos condensados (ou proantocianidinas) compreendem um grupo de oligômeros de polihidroxiflavan-3-ol e polímeros ligados por ligações carbono-carbono

entre subunidades de flavonoides. Sua reatividade com moléculas de significância biológica tem consequências fisiológicas e nutricionais. Seus múltiplos grupos hidroxila fenólicos levam a formação de complexos com proteínas, íons metálicos e outras macromoléculas como polissacarídeos. Eles são polímeros compostos por unidades flavonóis (KHANBABAE; VAN REE, 2001).

## 1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS NA CERVEJA

Segundo a legislação brasileira, “cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”. Existem aproximadamente 1000 a 2000 compostos químicos na cerveja e um desses compostos de características importantes são os compostos fenólicos. As substâncias fenólicas tem papel determinante na cor, sabor, aroma, limpidez e grande potencial antioxidante (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

As cervejas também são classificadas de acordo com o processo de fermentação em cervejas de alta ou baixa fermentação. As Lagers, o tipo de cerveja mais consumido, são produzidas por baixa fermentação, que se processa sob refrigeração (normalmente entre 6 e 15° C). Após a fermentação, as células de levedura se depositam no fundo do fermentador e geralmente são removidas. Em contraste, as cervejas do tipo Ale são produzidas por fermentação “alta”, ocorrendo entre 16 e 24°C, após o que as células de levedura sobem à superfície do meio de fermentação, formando uma película espessa que geralmente não é completamente removida. Diferentes estilos de cerveja, como Pilsen (lager americana padrão), Bock, Weizen, Pale e Brown Ales, Rauchbier e muitas outras são originados de variações no processamento, nas formulações e na composição dos ingredientes. Os estilos de cerveja também podem variar entre as regiões produtoras, de acordo com aspectos culturais e disponibilidade de ingredientes (BAMFORTH, 1999).

Na fabricação da cerveja, dois componentes básicos se destacam neste aspecto, o malte de cevada e o lúpulo, pois apresentam em sua composição compostos bioativos, em especial, compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos, encontrados nas plantas, que podem ser classificados pelo tipo e número de anéis aromáticos ligados a um grupo hidroxila subcomponentes(?) presentes. No processo de

produção, a adição de lúpulos, cereais e malte leva a um maior teor de compostos antioxidantes naturais na cerveja, principalmente compostos fenólicos (ZHAO et al., 2013).

Boronat et al. (2020) citam que existem evidências que sugerem que os efeitos benéficos da cerveja resultam de um efeito aditivo entre o teor de álcool e os compostos fenólicos contidos nela. Compostos fenólicos da cerveja derivam das suas matérias primas e processo produtivo, sendo que 30% derivam do lúpulo e 70% do malte de cevada e das transformações que esses compostos são submetidos durante o processo produtivo. As classes estruturais de polifenóis na cerveja incluem fenóis simples, derivados de ácido benzóico e cinâmico, cumarinas, catequinas, protoancianidinas di e tri-oligoméricas, chalconas, preniladas e iso- $\alpha$ - ácidos (INTELMANN et al., 2011). Os teores de compostos fenólicos na cerveja podem variar dependendo da quantidade e qualidade das matérias-primas e do próprio processo de fabricação de cerveja (RODRIGUES; GIL, 2011).

Um estudo feito por Moura-Nunes et al. (2016) em amostras de cervejas brasileiras identificou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a presença de 10 compostos fenólicos, todos pertencentes à classe de ácidos fenólicos. Dentre eles estão o 3,4-dihidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilacético, 4-hidroxifenilacético, 5-cafeoilquinico, benzóico, p-ácidos cumárico, ferúlico, gálico, seríngico e vanílico, sendo o ácido gálico o fenólico encontrado em maior quantidade na maioria delas. Já em um estudo feito por Zhao et al. (2010) em 34 cervejas chinesas comerciais, foram identificados nove compostos fenólicos principais, sendo eles ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina, ácido vanílico, ácido seríngico, epicatequina, p-ácido cumárico e ácido ferúlico. Nesse estudo, ácido gálico e ácido ferúlico foram encontrados em maior proporção. Em um estudo feito em cervejas europeias, a presença do ácido gálico não foi relatada por Nardini e Ghiselli (2004), sendo o ácido ferúlico o mais abundante.

Sabe-se que as matérias-primas utilizadas na produção da cerveja, assim como os parâmetros de processamento do malte e da cerveja afetam a composição química do produto final, o que pode explicar as divergências no perfil dos compostos fenólicos entre as cervejas brasileiras analisadas no estudo feito por Moura-Nunes et al. (2016) e as analisadas em outros trabalhos. Na tabela 1.2 podemos ver os principais compostos fenólicos encontrados em diversas cervejas.

Os compostos fenólicos derivados do lúpulo e do malte apresentam uma classe de substâncias diversa e complexa que compreende fenóis simples e ácidos fenólicos, bem

como taninos condensados e hidrolisáveis, como já citado por Bamforth (1999). Entre os cereais, apenas a cevada e o sorgo contêm flavonóis oligoméricos. Embora o malte de cevada contenha uma quantidade muito menor de polifenóis total por peso do que o lúpulo, ainda contribui com 70% a 80% do total de polifenóis na cerveja (ALMAGUER et al., 2014).

Tabela 1.2 – Compostos fenólicos encontrados na cerveja, sua classe e fórmula molecular

Classe	Composto	Fórmula Molecular	Referência
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 4-hidroxibenzóico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018; ZHAO et al., 2010)
Ácido hidroxibenzóico	Ácido m-hidroxibenzóico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	(MAROVA et al., 2011; MITIĆ et al., 2014)
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 4-dihidroxifenilacético	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	(MITIĆ et al., 2014)
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Protocatecuído	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	(MITIĆ et al., 2014)
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Galico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	(MAROVA et al., 2011; MOURA-NUNES et al., 2016)
Ácido Hidroxibenzóico	Ácido Vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	(WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)(MOURA-NUNES et al., 2016)
Ácido hidroxicinâmico	Ácido Clorogênico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	(MAROVA et al., 2011; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido p-cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	(MOURA-NUNES et al., 2016; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido Cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	(MITIĆ et al., 2014; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido Siringico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	(MOURA-NUNES et al., 2016; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido Ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	(MAROVA et al., 2011; MITIĆ et al., 2014)
Ácido Hidroxicinâmico	Ácido Sinápico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	(MITIĆ et al., 2014; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Ácido Fenilacético	Ácido 3,4 dihidroxifenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	(MOURA-NUNES et al., 2016)
Ácido Fenilacético	Ácido 4-hidroxifenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	(MOURA-NUNES et al., 2016; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018)
Fenol simples	Ácido Benzóico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	(MOURA-NUNES et al., 2016)
Flavanol	Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(MAROVA et al., 2011; MITIĆ et al., 2014)
Flavanol	Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(MAROVA et al., 2011; MITIĆ et al., 2014)
Flavanona	Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	(MAROVA et al., 2011)
Flavona	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	(MAROVA et al., 2011)
Flavona	Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	(MAROVA et al., 2011)



Flavonóide	Xantohumol	$C_{21}H_{22}O_5$	(MAGALHÃES et al., 2008; MAROVA et al., 2011)
Flavonol	Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	(MAROVA et al., 2011)
Iso-flavonóide	Isoxantonhumol	$C_{21}H_{22}O_5$	(MAGALHÃES et al., 2008; MAROVA et al., 2011)

---

### 1.3 MATÉRIAS PRIMAS DA CERVEJA

#### 1.3.1 Malte de Cevada

A cevada é uma gramínea da espécie *Hordeum vulgare*, sua cultura é realizada preferencialmente em climas temperados e atualmente para obtenção do malte de cevada leva-se até 9 dias. Ela é o cereal mais utilizado na produção de malte para a cerveja, além do trigo e centeio que também são bastante difundidos para essa produção. No processo de fabricação da cerveja, a proporção de malte perde apenas para a água na obtenção da bebida final. Os compostos fenólicos do malte de cevada representam a principal fonte de compostos fenólicos na cerveja. Os mais abundantes são os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, aminas fenólicas, aminoácidos fenólicos e  $\alpha$ -ácidos e iso- $\alpha$ -ácidos (BORONAT et al., 2020).

Os polifenóis antioxidantes mais importantes na cevada são principalmente ligados aos polissacarídeos da parede celular na camada externa dos grãos de cevada (NACZK; SHAHIDI, 2004). Durante o processamento do malte, esses compostos podem ser dissolvidos por esmagamento e ação enzimática. Segundo Guido (2015), outro grupo importante de compostos antioxidantes, as melanoidinas, são produzidas durante o tratamento térmico do malte verde e do mosto. No processo de malteação, a reação de Maillard ocorre quando o malte é tratado em alta temperatura (150-200 °C), resultando na produção dessas melanoidinas.

A cevada contém diferentes classes de compostos fenólicos, como derivados do ácido benzóico e cinâmico, proantocianidinas, quininas, flavonóis, chalconas, flavonas, flavanonas e compostos aminofenólicos. Podem ser encontrados na forma livre, esterificada ou ligada e se distribuem quantitativamente entre os diferentes tecidos do grão. Ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) e ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) são os principais ácidos fenólicos de baixo peso molecular em grãos de cevada, encontrado principalmente

nas camadas externas (casca, pericarpo, testa e aleurona), mas também detectados no endosperma. Outros ácidos fenólicos ligados encontrados na cevada são vanílico, sinapínico e ácidos p-hidroxibenzóicos (KIM, M. *et al.* 2007). Os grãos de cevada também contêm uma variedade de flavan-3-ols de monômeros ((+) - catequina e (-) - epicatequina), dímeros (prodelfinidina B3 e procianidina B3 ), e trímeros (procianidina C2), até taninos derivados de flavonóides de peso molecular mais alto (DVORAKOVA et al., 2008).

Os compostos fenólicos na cevada consistem em ácidos fenólicos livres e ligados (HOLTEKJØLEN; KINITZ; KNUTSEN, 2006), lignanas (PEÑALVO et al., 2005) flavanóis (HOLTEKJØLEN; KINITZ; KNUTSEN, 2006) e fenolamidas ou hortadinas (KOHYAMA; ONO, 2013). As ligações entre ácidos fenólicos e os polissacarídeos da parede celular são passíveis de hidrólise alcalina, o que facilita a análise de quantificação (NARDINI; GHISELLI, 2004). Taninos condensados foram encontrados principalmente na camada de aleurona (POLLOCK; POOL; REYNOLDS, 1960). As protoancianidinas da cevada são compostas por monômeros (+)- catequina e (+)- galocatequina (FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000), formando principalmente duas procianidinas diméricas e quatro prodelfinidinas dimeras triméricas (HOLTEKJØLEN; KINITZ; KNUTSEN, 2006).

O conteúdo e composição de polifenóis da cevada dependem da variedade e proveniência da cevada, logo, diferenças varietais no conteúdo de fenólicos individuais, totais e atividade antioxidante ou poder redutor tem sido amplamente pesquisadas (MOREIRA et al., 2013).

### 1.3.2 Lúpulo

Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta dióica pertencente à família das *cannabaceae* (BARTH, 2013). Para fins de fermentação, os cones de lúpulo não fertilizados de plantas femininas são preferencialmente usados. Os cones de lúpulo secos contêm até 4% de polifenóis (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

O lúpulo é adicionado na cerveja pra transmitir amargor, aroma e estabilidade microbiológica. Considerando as adições tradicionais de lúpulo no processo de produção da cerveja, onde eles são empregados para atingir o amargor desejado em cervejas lager de baixa fermentação, os polifenóis de lúpulo constituem de 20% a 30% do total de polifenóis da cerveja (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

A maioria dos polifenóis do lúpulo é composta por compostos de alto peso molecular, como os taninos do tipo flavanol. Apenas cerca de 20% dos polifenóis do lúpulo consistem em substâncias de baixo peso molecular como catequina ou proantocianidinas, ácidos carbonados fenólicos (por exemplo, ácido ferúlico) e flavonóis (quercetina, kaempferol) que são glicosidicamente ligados a vários açúcares. Alguns polifenóis são quase exclusivos do lúpulo. Cada planta tem um padrão polifenólico típico e o lúpulo provou ser uma fonte rica em polifenóis prenilados (prenilflavonóides). O lúpulo é a única fonte de prenilflavonóides na cerveja, que são secretados junto com ácidos amargos e óleos essenciais pelas glândulas de lupulina das inflorescências. O xanthohumol é o prenilflavonóide principal do lúpulo (SOCHA et al., 2017).

Os polifenóis mais valiosos do lúpulo são agrupados em resinas duras e macias, polifenóis e óleos essenciais. As resinas de lúpulo estão localizadas nas glândulas de lupulina. Resinas totais compreendendo 15% a 30% do cone de lúpulo são obtidas por extração com éter ou metanol. Resinas macias contendo as principais substâncias amargas ( $\alpha$ - e  $\beta$ - ácidos) são posteriormente extraídas com n- hexano. A parte que é insolúvel em n- hexano é denominado resina dura (ALMAGUER et al., 2014).

Os fenólicos de resina dura compreendem os prenilflavonóides (PRENCIPE et al., 2014) e multifilolglucosídeos (DRESEL; DUNKEL; HOFMANN, 2015). Na resina dura de lúpulo, o xanthohumol é acompanhado por 13 outros compostos de chalcona prenilados, todos presentes em concentrações 10 a 100 vezes menores do que o xanthohumol. Prenilchalconas ou prenilflavonoides são encontrados apenas em um número limitado de famílias de plantas, enquanto o xanthohumol é encontrado apenas no lúpulo (STEVENS; PAGE, 2004). O xanthohumol possui atividades anti-inflamatória, antioxidante, anti-lipoperoxidativa e também efeitos antiangiogênicos, antiproliferativos e apoptóticos, avaliados principalmente em vitroestudos, razoavelmente sugerem uma potencial atividade quimiopreventiva (PRENCIPE et al., 2014).

Os outros compostos fenólicos, que fazem parte da resina dura, co-, n- e ad-multifidol glucopiranosídeos, são responsáveis pelo sabor amargo do lúpulo. Esses compostos são derivados de (acil-) floroglucinol, assim como os  $\alpha$ - e  $\beta$ - ácidos (DRESEL; DUNKEL; HOFMANN, 2015).

Além dos constituintes da resina dura, os cones de lúpulo contem flavanóis monoméricos e oligoméricos ou proantocianidinas, flavanol glicosídeos, principalmente

dímeros e trímeros de catequina, epicatequina, galacatequina e epigalocatequina (MAGALHÃES et al., 2010).

Li (2006) fizeram um estudo de 13 amostras de lúpulo e relataram que as procianidinas são a classe dominante das proantocianidinas do lúpulo (88%), acompanhadas por quantidades menores de prodelfinidinas (9,9%) e propelargonidinas (2,1%). Esses autores também descreveram catequina, epicatequina, procianidinas B1 a B4. e um E- (4  $\beta$   $\rightarrow$  8) -E- (4  $\beta$   $\rightarrow$  8) Trímero -C como os flavanóis mais abundantes no lúpulo.

McMurrough et al. (1996) descobriram que os extratos de polifenóis do lúpulo contêm proporções muito mais baixas de flavanóis simples do que os extratos obtidos da cevada. Além das diferenças varietais (lúpulos de aroma: menor teor de  $\alpha$ -ácido, geralmente possui maior em teor de polifenol), o teor de polifenóis de lúpulo depende muito do tipo de lúpulo e tempo de colheita (ALMAGUER et al., 2014). Ano de colheita e o tempo de colheita também afetam significativamente a qualidade e a quantidade de polifenóis em cones de lúpulo. Inui et al. (2017) descobriram que o teor de polifenóis do lúpulo aumentava quando as amostras eram colhidas mais cedo.

Com apenas uma pequena porção sendo comercializada como lúpulo cru, a maioria do lúpulo produzido é processada em *pellets* de lúpulo, extratos de lúpulo e produtos isomerizados. Os *pellets* de lúpulo são produzidos com diferentes graus de enriquecimento de lupulina (tipo 45 ou 90, com *pellets* tipo 45, rendendo *pellets* concentrados de 45 kg a partir de 100 kg de lúpulo cru). Para a produção de *pellets* de lúpulo, o lúpulo cru é seco (50 a 60°C por 6 a 10 horas), finamente moído e depois peletizado. A secagem e moagem causam pequenas perdas no teor de polifenóis e redução da atividade, enquanto a peletização não resulta em alterações significativas. O conteúdo total de polifenóis e a atividade redutora do lúpulo diminuem durante o armazenamento (KROFTA; MIKYŠKA; HAŠKOVÁ, 2008). Em um experimento de armazenamento de longo prazo feito por Mikyska e Krofta (2012), o teor de polifenóis diminuiu significativamente após 12 meses de armazenamento (perda de polifenóis totais: 30% a 40%, perda de flavonoides: 20% a 30%, perda de antocianogênios : 5% a 20%).

### 1.3.3 Levedura

As leveduras são de grande importância econômica e têm sido utilizadas há muito tempo para a produção de bebidas alcoólicas. Atualmente, uma gama de processos

fermentativos utiliza as leveduras visando a produção dos mais variados tipos de produtos. Elas são responsáveis pela fermentação, processo no qual os açúcares presentes no mosto (mistura de malte e água) são convertidos em álcool etílico (etanol) e dióxido de carbono (Barth 2013).

Elas são classificadas como fungos, apresentam-se normalmente sob a forma unicelular e geralmente se reproduzem por brotamento. No processo de brotamento, uma nova célula se forma como uma pequena protuberância da célula antiga, o botão aumenta gradualmente e depois se separa. Embora a maioria das leveduras se reproduza apenas como células únicas, sob algumas condições, algumas leveduras podem formar filamentos (SARANRAJI P).

A fermentação do mosto da cerveja, historicamente, é realizada por leveduras do gênero *Saccharomyces*, pertencentes à família *Saccharomycetaceae*. O gênero *Saccharomyces* apresenta várias linhagens capazes de produzir dois metabólitos primários importantes, etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). De forma clássica, para estilos de cerveja de baixa fermentação (cervejas fermentadas a baixas temperaturas, estilo Lager) são utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus*, enquanto aquelas de alta fermentação (cervejas fermentadas a temperatura superior, estilo Ale) recorrem a cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (KUNZE, 2004).

Existem cepas de leveduras que possuem um variante de um gene denominado POF, *Phenolic off flavour*, essas leveduras, que normalmente são utilizadas na produção de cervejas belgas e de trigo, são capazes de metabolizar o ácido ferúlico presente do mosto e transformar em 4-vinilguaicol, trazendo aroma de cravo para a cerveja (Silva, Carlos 2019).

## 1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSAMENTO DA CERVEJA

### 1.4.1 Malteação da Cevada

Os historiadores acreditam que a relação entre os humanos e os grãos é anterior à história registrada, e a principal causa para o afastamento da caça o surgimento dos povoados veio do desejo de cultivar grãos e cereais. Os grãos de cereais forneciam uma fonte estável e confiável de alimento, permitindo que os primeiros humanos tivessem mais estabilidade social e biológica. Os grãos são exclusivamente responsáveis pela coloração da cerveja, mas contribuem muito com o sabor e aroma (BARTH, 2013).

Embora os grãos crus devidamente secos fiquem bem armazenados devido à sua natureza densa e resistente, eles precisam de algum tipo de processamento para torná-los mais adequados ao consumo humano. No caso da cerveja eles passam pelo processo de malteação. A malteação é um processo de germinação controlada, que tem como objetivo promover reações enzimáticas que transformam moléculas de alto peso molecular em moléculas solúveis e acessíveis (POZEN, 2015). Nesse processo existem as etapas de maceração, germinação e secagem.

Na etapa de maceração ocorre a elevação da umidade dos grãos até 45% para que o transporte de metabólitos aconteça por todo o grão. Aqui acontece a lixiviação dos compostos fenólicos. Na etapa de germinação ocorre a síntese das amilases, peptidases e  $\beta$ -glucanases, e as substâncias de reserva ficam suscetíveis à hidrólise. Aqui ocorre a produção das enzimas, a quebra da parede do endosperma, a quebra da matriz proteica e consequentemente o acesso aos grãos de amido. A secagem visa a redução gradual da umidade do grão (possibilitando quer a sua conservação quer a cessação da atividade enzimática) assim como o desenvolvimento de cores e aromas desejados consoante o tipo de malte que se pretende produzir. Nesse processo pode ocorrer a formação de melanoidinas, ajudando no incremento desses compostos (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

O malte de cevada ainda é a fonte de carboidrato mais usada no processo de fabricação, no entanto outros cereais malteados e não mateados também são usados devido aos custos mais baixos das matérias-primas. O processo de malteação é responsável por modificações na composição da cevada, envolvendo alterações e degradação de compostos fenólicos endógenos (NNS et al., 2007). Alguns autores demonstraram que os teores de compostos fenólicos no malte são geralmente mais elevados do que na cevada (ZHAO; ZHAO, 2012), mas as proporções dos diferentes grupos são quase idênticas, sugerindo que uma melhor extração de flavonoides e ácidos fenólicos no malte é possível após a secagem (GOUPY et al., 1999).

Durante a maltagem, os ácidos fenólicos são parcialmente liberados devido à degradação de componentes complexos da cevada, porém, o cinamol esterase, que é capaz de liberar ácidos hidroxicinâmicos de sacarídeos cinamolados, também foram encontrados na cevada e no malte (VANBENEDEN, 2007). Verificou-se que a liberação de ácido ferúlico pela feluriol esterase é aumentada na presença de outras enzimas degradantes da parede

celular, devido à solubilização de fragmentos de xilanases, o que permite uma degradação posterior pela esterase de ácido ferúlico (TAKÓ et al., 2020).

Samaras et al. (2005) observaram em um estudo que o ácido ferúlico reage com os intermediários da reação de Maillard durante o aquecimento (prolina e glucose). Isso pode explicar a diminuição na concentração de ácido ferúlico nas temperaturas mais altas. Assim, as concentrações de ácido ferúlico e ácido cumárico foram maiores em grãos de cevada de maltes mais claros em comparação com maltes mais escuros (MOREIRA et al., 2013). Além da queima, as etapas de maceração e germinação também influenciam o teor de polifenóis do malte. Considerando que a maioria dos estudos relatou um aumento no conteúdo fenólico total medido pelo ensaio Folin-Ciocalteu (HA et al., 2016), o conteúdo de flavanóis permaneceu inalterado ou diminuiu ligeiramente durante a maltagem (DVORAKOVA et al., 2008).

Embora haja alguma evidência de que o conteúdo de flavonóides livres permanece praticamente inalterado durante a maltagem, foi relatado que há aumento significativo na quantidade deste glicosídeo catequina durante a maltagem, o que pode explicar a diminuição no conteúdo de (+) – catequina (DVORAKOVA et al., 2008).

Outros compostos possuindo poder redutor são gerados durante a secagem pela Reação de Maillard, devido à produção de, por exemplo, melanoidinas. Logo, manter altos níveis de antioxidantes durante a fermentação, limitando assim a formação de aldeídos, é crucial para a estabilidade da cerveja (DELCOUR et al., 1982; KELKELEIRE, 2000).

#### 1.4.2 Processo de fabricação da cerveja

A fim de expor o amido contido no interior do malte é necessário submetê-lo à moagem. A quebra do grão é importante para que as enzimas possam atuar em todos os elementos que o constituem, pois torna o conteúdo do grão acessível à ação enzimática. Existem duas técnicas principais de moagem: moagem a seco e moagem úmida. A moagem seca é o método convencional, pelo qual o malte é moído sem ser umedecido. Durante a moagem úmida a água é adicionada ao malte de forma a permitir a desintegração ideal do endosperma enquanto a casca é mantida intacta. Porém, esse tipo de moagem leva a uma diminuição do ácido ferúlico e da concentração de fenólicos totais (SZWAJGIER, 2011).

O malte moído é misturado em uma tina de mostura com água cervejeira, sendo submetido a diferentes temperaturas por períodos de tempo determinados. O objetivo dessa

etapa é tornar solúveis em água os compostos do malte, substâncias que na sua forma original são insolúveis (amidos e proteínas), através de reações enzimáticas (BARTH, 2013).

Durante a mosturação, o amido do malte é convertido em açúcar fermentável pelas enzimas alfa-amilase e beta-amilase. Em geral, a mosturação faz com que o malte libere uma grande quantidade de fenóis ligados devido às condições adequadas para a ação enzimática, resultando em um aumento significativo de compostos fenólicos e atividade antioxidante (MARCHIONI et al., 2011). Os ácidos cinâmicos livres são solubilizados durante essa etapa tanto por extração quanto por liberação enzimática (VANBENEDEN, 2007). A temperatura ótima da cinamoil esterase é de 30°C, porém, uma vez que a liberação de ácido cinâmico na mosturação é aumentada pela ação sinérgica de outras enzimas degradantes de arabiloxilano, foi encontrado uma temperatura de liberação máxima de ácido ferúlico na mosturação a partir de 40°C (VANBENEDEN, 2007). Segundo Schwarz et al. (2012) a melhor condição para a liberação de ácido ferúlico durante a mosturação é em torno de 40°C e pH 5,8, mas acima de 65°C, nenhuma atividade enzimática relacionada com a liberação de ácido fenólico é detectada mais.

Com o progresso da mosturação, estudos mostram que o teor de melanoidinas tende a aumentar gradualmente, o que indica que o processo de mosturação promove a formação de melanoidinas (ZHAO; ZHAO, 2012). Segundo Li et al. (2016) a diminuição das substâncias durante o envelhecimento, como compostos de carbonila na cerveja, resultam no aprimoramento da atividade antioxidante em geral, além disso, devido ao aumento da temperatura, a hidrólise de proteínas e polissacarídeos, a formação de melanoidinas produzidas por produtos Maillard e a dissolução maciça de compostos fenólicos, faz com que essa atividade antioxidante aumente, assim como a eliminação de radicais livres.

Segundo Vanbeneden (2007) apenas uma pequena parte dos ácidos hidroxicinâmicos do malte são extraídos para o mosto durante a mosturação. A maioria permanece no bagaço do malte. Considerando uma rampa de mosturação compreendendo descanso proteico (30 minutos a 45°C), sacarificação (63°C e 70°C por 30 e 20 minutos) e inativação enzimática (78°C por 10 minutos), o conteúdo fenólico total aumentou até 78°C, mas depois começou a diminuir após a etapa de inativação da enzima segundo Zhao (2012).

Após a inativação enzimática acontece a separação do bagaço de malte do mosto líquido, que será levado à fervura. Os resíduos sólidos são usados como meio filtrante do



mosto, sendo composto por cascas de malte, traços de plúmula, aleurona, proteína coagulada e resquícios da parede das células (VERBELEN et al., 2010).

Na sequência, o bagaço é lavado a fim de extrair os açúcares retidos no mesmo. Em um estudo feito por Fumi et al. (2011) há uma diminuição dos compostos fenólicos do mosto após essa etapa, ao contrário do que foi encontrado por Pascoe et al. (2004), que observaram um aumento nos polifenóis durante a lavagem dos grãos, atribuindo a esse material ser mais rico em compostos fenólicos.

A fim de adquirir a estabilidade coloidal do mosto, com a coagulação das proteínas e dos polifenóis presentes, ele é submetido à fervura. Nessa etapa busca-se também atingir estabilidade microbiológica, fazendo a esterilização do mosto, assim como dissolução e isomerização dos compostos do lúpulo. Busca-se também a estabilidade sensorial eliminando compostos aromáticos indesejáveis (DMS) (BARTH, 2013). Ainda nessa etapa, segundo Forster (2013) durante a ebulição do mosto, devido à adição de lúpulos, reações de polimerização, interações proteína-polifenol e precipitação há uma mudança na composição dos polifenóis do mosto. Nessa etapa, os polifenóis são extraídos do lúpulo com uma taxa de transferência de polifenóis totais de 50% a 70%. No entanto, eles citam que esses números diferem entre os diferentes grupos de substâncias, de acordo com sua polaridade e sua tendência em formar complexos com as proteínas do mosto.

Conforme citado por Wannemacher et al. (2018), ocorrem mudanças nos polifenóis do lúpulo durante a ebulição porque a precipitação da proteína depende do grau de polimerização do polifenol. De maneira geral, os antocianógenos do lúpulo tendem a ser mais reativos do que os antocianógenos do malte, o que leva a maiores taxas de eliminação. Polifenóis menos polimerizados ou menos oxidados foram mais ativos na precipitação das proteínas. Siebert et al. (1996) citaram que compostos fenólicos oligoméricos mais elevados são mais ativos na formação de complexos com proteínas. Porém, pequenas moléculas fenólicas como os ácidos fenólicos também interagem com as proteínas, e são adsorvidas pelo *trub* quente. O *trub* quente constitui-se de proteínas (40% a 70%), substâncias amargas (7% a 32%), substâncias orgânicas (polifenóis) (20% a 30%) e cinzas (5%) (KÜHBECK et al., 2006).

A quantidade de *trub* quente formado depende do tempo de ebulição. É provável que a maior parte das proantocianidinas oligoméricas superiores seja removida do mosto com a sedimentação do *trub* quente, ou absorvidas às células de leveduras durante a fermentação

(SIEBERT; TROUKHANOVA; LYNN, 1996). Após a fervura e sedimentação, apenas catequina e proantocianidina B3 foram encontradas na cerveja final (ASANO et al., 1984).

Ao final da fervura realiza-se o *Whirpool*, processo no qual o mosto é bombeado dentro da panela de forma tangencial, gerando um fluxo de rotação, o qual leva o *trub* quente a formar um bolo no fundo da panela. Dessa forma, a força centrípeta faz com que toda a matéria sólida e insolúvel se concentre no centro da panela, facilitando a remoção do mosto limpo. Durante essa etapa os compostos fenólicos diminuem significativamente, devido à adsorção ao *trub* quente (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

Com o mosto resfriado e aerado dentro do fermentador, inocula-se a levedura para iniciar o processo de fermentação. Nessa etapa são produzidos principalmente etanol e CO<sub>2</sub>, através da metabolização dos açúcares fermentáveis encontrados no mosto (maltotriose, maltose, glicose etc.) por ação da levedura. Porém, no decorrer do processo, numerosos subprodutos também são desenvolvidos, como, os álcoois superiores aromáticos e alifáticos, ácidos orgânicos, ésteres, compostos sulfurados e carbonílicos e os álcoois polihídricos, além disso, muitas substâncias do mosto também passam por assimilação pela levedura (SZWAJGIER, 2009).

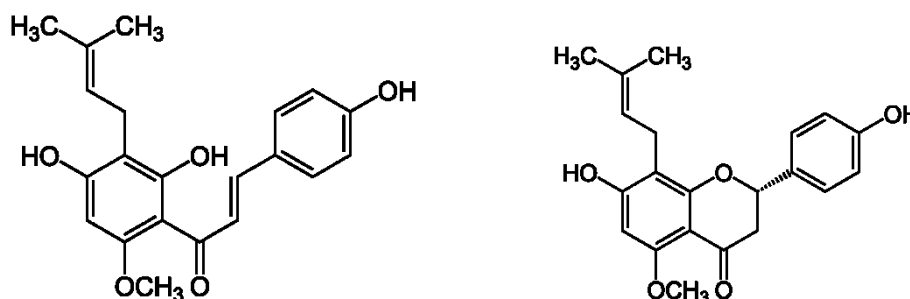
É sabido que o ácido ferúlico diminui em até 35% durante o *Whirpool*, por outro lado (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) cita que foi descoberto que o ácido ferúlico aumenta durante a fermentação, e isso é atribuído à possível atividade da feruloil esterase da levedura.

O xanthohumol é um dos derivados dos prenilflavonóides mais bem caracterizados descobertos até agora. A própria planta de lúpulo não é capaz de converter chalconas em flavanonas (flavonóides), logo, as prenilchalconas do lúpulo podem ser isomerizadas à iso-xanthohumol durante o processo de fervura e fermentação. Isso foi associado à fervura e fermentação uma vez que foram encontrados níveis mais elevados de prenilflavonas do que prenilchalconas na cerveja, embora o lúpulo tenha quantidades muito baixas de prenilflavonas (VENTURELLI et al., 2016).

Em um estudo precoce, uma cerveja do tipo Lager apresentou um rendimento geral de xanthohumol de 30%, 98% dos quais estavam presentes como iso-xanthohumol (STEVENS; PAGE, 2004). Durante o processo de fabricação da cerveja as principais perdas de xanthohumol são devido à adsorção ao *trub* quente, ao fermento e ao *trub* frio. Stevens e Page (2004) verificaram que 13% do xanthohumol do lúpulo permaneceu nele após a

ebulição do mosto e 12% foram eliminados por adsorção ao *trub* quente. Após a fermentação, maturação e clarificação, 17% foram perdidos devido à adsorção ao *trub* frio (6%) e levedura (11%). A solubilidade do iso-xanthohumol no mosto e na cerveja é maior que a do xanthohumol, que tem maior probabilidade de se adsorver a proteínas do *trub* quente ou células de leveduras. Na Figura 1.5 temos a ilustração das estruturas do xanthohumol e do iso-xanthohumol na isomerização durante a ebulição do mosto.

Figura 1.5 - Estrutura do Xanthohumol e Iso-xanthohumol



Fonte: (VENTURELLI et al., 2016)

A cerveja é analisada em três parâmetros: microbiológico, coloidal e a estabilidade no paladar. A estabilização do sabor é atingida a partir da contenção de substâncias que proporcionam sabor e reduzem o oxigênio adicionado na cerveja clarificada. Para garantir a condição microbiológica são removidas as células de levedura. Sendo retiradas as partículas maiores, para evitar a coagulação provocada por compostos fenólicos e proteicos que ocasionam o fenômeno conhecido como *chill haze*, que acontece em cervejas que passaram por esse processo em temperaturas reduzidas. Sendo assim, estes aspectos, conferem a estabilidade e, são assegurados pela clarificação da bebida (VERBELEN et al., 2010).

Durante a clarificação a frio, os complexos de proteína-polifenol são precipitados, e portanto, eliminados da cerveja. Miedl e Bamforth (2004) sugeriram em seu trabalho armazenar a cerveja na temperatura mais baixa possível para se obter a estabilidade coloidal, mas além disso outras técnicas envolvendo o uso de adsorventes específicos para proteínas ou polifenóis, enzimas proteolíticas ácido tânico são utilizadas.

O polivinilpirrolidona (PVPP) é comumente usado na fabricação de cerveja como um meio de aumentar a estabilidade coloidal da cerveja por meio da remoção de polifenóis ativos após a fermentação. É bastante escolhido como agente estabilizador devido à semelhança estrutural com a prolina. As proteínas ricas em prolina estão envolvidas na formação da turbidez da cerveja durante o seu armazenamento. No entanto, quando aplicado na cerveja, parte dos polifenóis ativos da turbidez são protegidos da remoção pela sua ligação à proteínas (SIEBERT; TROUKHANOVA; LYNN, 1996). A formação dos complexos entre polifenóis e PVPP e proteínas ricas em prolina é determinada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e polares. Em um estudo, 48% dos polifenóis totais (78% dos flavanóis totais, 90% de prodelphinidina, 96% de procianidina, 79% de (+)-catequina e 88% de (-)-epicatequina) foram removidos da cerveja tratada com PVPP (MCMURROUGH et al., 1996).

A estabilidade do sabor tem sido considerada um dos fatores importantes na determinação da vida útil da cerveja embalada. Cervejas frescas com fragrância única e sabor refrescante são atraentes para os consumidores, enquanto ocorrência inevitável de alguns sabores estranhos, incluindo papelão, solvente, notas de madeira e caramelo durante o armazenamento resulta em uma diminuição significativa na potabilidade da cerveja (SAISON et al., 2010)

Geralmente, o envelhecimento da cerveja está relacionado ao desenvolvimento de compostos de carbonila, compostos de enxofre, piridinas, furanos, etc (SAISON et al., 2010). O aparecimento desses sabores típicos do envelhecimento durante o armazenamento da cerveja tem sido associado à oxidação de álcoois superiores, degradação oxidativa de ácidos amargos derivados do lúpulo, degradação de Strecker de aminoácidos, oxidação de ácidos graxos insaturados e condensações aldólicas (MALFLIET et al., 2008). A maioria das pesquisas anteriores tinha focado em trans-2-nonenal com sabor de papelão e sua formação por oxidação lipídica devido ao seu extremo baixo limiar de sabor (BRAVO et al., 2008).

Delcour et al. (1982) investigaram a influência do acetaldeído na formação da turbidez e estabilidade dos compostos fenólicos da cerveja. Segundo eles, as reações dos compostos fenólicos são afetadas pelo acetaldeído, resultando em uma maior queda na concentração de catequina. Além disso, a formação de turbidez também foi influenciada pelo acetaldeído.

Segundo Vanbeneden et al. (2006) a degradação dos trans-iso- $\alpha$ -ácidos mostraram um declínio acentuado, enquanto os isômeros cis eram mais estáveis. Assim como os ácidos amargos, os compostos fenólicos também não são imunes ao armazenamento. Li et al. (2016) encontraram uma diminuição no conteúdo fenólico total de 16% e 23% durante 6 meses de armazenamento. A diminuição do conteúdo fenólico total foi acompanhada por uma redução na atividade antioxidante da cerveja comercial armazenada. Heuberger et al. (2012) descobriram que o xanthohumol diminuía durante o armazenamento, enquanto o conteúdo do seu isômero iso-xanthohumol aumentava.

Foi estudada também a evolução de compostos específicos do lúpulo durante o armazenamento da cerveja. Intelmann et al. (2011) descobriram que os flavonóides prenilados são extremamente estáveis ao longo do armazenamento da cerveja. Na verdade, a concentração de flavonóides prenilados em uma cerveja armazenada por 10 anos a 20 °C em uma garrafa de cerveja âmbar não era drasticamente diferente do que em uma cerveja fresca.

A estabilidade da cerveja já foi estudada por processos forçados de envelhecimento, porém, a condição desses testes forçados que incluíram exposição à luz, oxigênio ou calor resultaram em mudanças pequenas em relação ao envelhecimento da cerveja em condições normais de armazenamento. Logo, as condições de armazenamento de maneira natural da cerveja precisam ser mais investigadas (INTELMANN et al., 2011).

## 1.5 ALTERNATIVAS PARA MELHORAR A BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA CERVEJA

Novas estratégias tecnológicas, como leveduras especiais, manipulação da atividade enzimática, adição de frutas e *dry hopping* podem ser relevantes para melhorar o perfil fenólico da cerveja e atingir níveis fenólicos com benefícios tanto para a estabilidade da cerveja quanto para a saúde do consumidor.

Devido aos seus benefícios para a saúde, o xanthohumol é mais muito interessante para a indústria cervejeira, o que levou a esforços para suprimir a isomerização durante a fermentação e para aumentar o rendimento geral do xanthohumol. Uma técnica para a produção de uma cerveja enriquecida com xanthohumol foi patenteada em (cervejas comerciais: 0,2 mg/L, cerveja enriquecida: 1 a 10 mg/L). Esta técnica compreende a adição de um produto de lúpulo enriquecido com xanthohumol (fator 5 a 10) no final da ebulição

do mosto após o resfriamento do mosto a 75 a 85°C seguido por resfriamento rápido (STEVENS; PAGE, 2004).

Cervejas pretas tendem a exibir níveis fenólicos até 3 vezes mais altos que as cervejas convencionais. O uso de maltes torrados em níveis intermediários, em combinação com moagem adequada e altas temperaturas de maceração em pH baixo pode levar à liberação de formas fenólicas ligadas e aumento da extração. Além de inibir a isomerização do xanthohumol por uma diminuição da temperatura, as melanoidinas presentes em maltes torrados têm sido investigadas como carreadores de xanthohumol. Supõe-se que a redução da isomerização do xanthohumol se deve à ligação do xanthohumol a substâncias torradas de maior peso molecular (300 a 600 kDa) (MAGALHÃES et al., 2008). Essas substâncias também agem como carreadores de xanthohumol, reduzindo assim as perdas durante a fermentação, filtração e estabilização com polivinilpolipirrolidona (PVPP) (WUNDERLICH; WURZBACHER; BACK, 2013).

O *dry hopping* é uma técnica usada principalmente para fornecer aromas e sabor intensos de lúpulo à cerveja, mas nos últimos anos vários estudos têm mostrado um aumento na estabilidade oxidativa da cerveja com o seu uso (HRABIA et al., 2022). Os  $\alpha$ -ácidos do lúpulo possuem fortes propriedades antioxidantes (MIKYŠKA; KROFTA, 2012). Kunz et al. (2014) verificou que adições tardias do lúpulo resultaram em um aumento de até 25% dos  $\alpha$ -ácidos no produto final resultando em um aumento na estabilidade oxidativa da cerveja. Hrabia et al. (2022) estudou o efeito da temperatura do *dry hopping* na estabilidade oxidativa das cervejas baseado na quantidade de radicais livres e presença de  $\alpha$ -ácidos não isomerizados no produto final. Um aumento significativo no parâmetro lag time (tempo após o qual se iniciam as reações de formação de radicais livres, que é um bom indicador do potencial antioxidante da cerveja) foi observado para todas as cervejas lupuladas por *dry hopping* a 20°C.

O enriquecimento da cerveja com frutas pode conferir a ela novos sabores e aumentar as concentrações de compostos bioativos (DUCRUET et al., 2017). Têm sido utilizadas como ingrediente há séculos, mas com o aumento do mercado das cervejas artesanais seu uso tem sido cada vez mais explorado. Seus extratos geralmente compreendem compostos fenólicos bioativos, logo, a sua inclusão tem trazido funcionalidade às cervejas (SANT'ANNA et al., 2013). O açúcar das frutas desencadeia uma fermentação secundária e sua adição durante a fermentação e maturação adicionam sabores e, principalmente,

carotenoides e polifenóis (NARDINI; GARAGUSO, 2020). Vários estudos têm demonstrado um aumento na quantidade de teor de fenólicos e associado isso ao aumento da capacidade antioxidante de cervejas que foram adicionadas de frutas (JUNG et al., 2017; MARTÍNEZ et al., 2017; NARDINI; FODDAI, 2020)

Em níveis mais baixos de adição de PVPP, os compostos fenólicos com graus mais elevados de hidroxilação e oligomerização são preferencialmente adsorvidos, enquanto níveis elevados de PVPP removem indiscriminadamente os polifenóis. Magalhães et al. (2010) encontraram constantes de equilíbrio de adsorção de compostos fenólicos no PVPP para aumentar com o número de grupos hidroxila. Isso ficou evidente com derivados de ácido cinâmico e benzóico, enquanto os flavonoides tinham constantes de adsorção mais altas do que esperado que seu número de grupos hidroxila (OH-) isoladamente, o que significa que encontrar esse equilíbrio entre a quantidade de PVPP é fundamental para aumentar a estabilidade da cerveja sem remover os compostos fenólicos em sua totalidade (MIKYŠKA et al., 2002).

## 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. *Humulus Lupulus* - a story that begs to be told: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014. <https://doi.org/10.1002/jib.160>

ASANO, K. et al. Affinity of Proanthocyanidins and Their Oxidation Products for Haze-forming Proteins of Beer and the formation of Chill Haze. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1139-1146, 1984. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866300>

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

BAMFORTH, C. W. The Science of beer haze. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 57, n. 3, p. 51-90, 1999. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0081>

BARTH, R. **The Chemistry of Beer: The Science in the Suds**. Wiley, 2013, cap. 15, p. 252-262. <https://doi.org/10.1002/9781118733745>

BORONAT, A. et. al. Beer phenolic composition of simple phenols, prenylated flavonoids and alkylresorcinols. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25112582>

BRAVO, A. et al. Formation of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4134-4144, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf703696p>

BRASIL, IN n° 65, de 10 de dezembro de 2019. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Disponível em <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolismo, and nutritional significance. **Nutritional Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

CANO, A.; CONTRERAS, C.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Using tannins as active compounds to develop antioxidant and antimicrobial chitosan and cellulose based films. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100156, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100156>

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2, p. 153-177, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>



DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. **Ingredients and Enrichments of Beverages**, p. 285-323, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816687-1.00009-6>

DELCOUR, J. A. et al. The reactions between polyphenols and aldehydes and the influence of acetaldehyde on haze formation in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 88, n. 4, p. 234-243, 1982. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1982.tb04100.x>

DRESEL, M.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T. Sensomics Analysis of Key Bitter Compounds in the Hard Resin of Hops (*Humulus Lupulus L.*) and Their Contribution to the Bitter Profile Of Pilsner Type Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3402-3418, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00239>

DUCRUET, J. et al. Amber Ale beer enriched with goji berries: The effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food Chemistry**, v. 226, p. 109-118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.047>

DVORAKOVA, M. et al. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography – ultraviolet detection – electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, p. 398-405, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.080>

ENOMOTO, H. Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging. **Current Research in Food Science**, v. 4, n. June, p. 821-828, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.11.006>

FORSTER, A.; GAHR, A. On the Fate of Certain Hop Substances during Dry Hopping. **Brewing Science**, v. 66, n. 7-8, p. 93-103, 2013.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 1, p. 56-64, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002170050589>

FUMI, M. D. et al. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 568-573, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.006>

GOUPY, P. et al. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1625-1634, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199909\)79:12%3C1625::AID-JSFA411%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12%3C1625::AID-JSFA411%3E3.0.CO;2-8)

HA, K. S. et al. Stimulation of Phenolics, Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities During Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seed Germination. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 211-217, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0549-2>

HARBORNE, J.B. General Procedures and Measurement of Total Phenolics. **Methods in Plant Biochemistry**, vol. 1, 1989. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461011-8.50007-X>

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBYLIA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.048>

HEUBERGER, A. L. et al. Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1284-1289, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.048>

HOLTEKJØLEN, A. K. KINITZ, C.; KNUTSEN, S. H. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2253-2260, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf052394p>

HRABIA, O. et al. Effect of dry hopping on the oxidative stability of beer. **Food Chemistry**, v. 394, n. 5, p. 1939-1953, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133480>

INTELMANN, D. et al. Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1939-1953, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104392y>

INUI, T. et al. Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols. **Food Chemistry**, v. 225, p. 69-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.002>

JUNG, K. et al. Influence of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Fruit Addition on Quality Characteristics and Antioxidant Activities of Beer. **International Journal of Sciences**, v. 3, n. 8, p. 186-191, 2017. <https://doi.org/10.18483/ijSci.1411>

KELKELEIRE, D. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. **Química nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. **Natural Product Reports**, n. 18, n. 6, p. 641-649, 2001. <https://doi.org/10.1039/b101061l>

KIM, M. et. al. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4802-4809, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf0701943>

KOHYAMA, N.; ONO, H. Hordatine A  $\beta$ -d-glucopyranoside from ungerminated barley grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1112-1116, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf304453c>

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00321.x>

KÚHBECK, F. et al. Influence of lauter turbidity and hot trub on wort composition, fermentation, and beer quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 64, n. 1, p. 16-28, 2006. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0016>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

KUNZ, T. et al. Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 415-425, 2014. <https://doi.org/10.1002/jib.162>

KUNZE, W. **Technology brewing and malting 2004**. Germany, VLB Berlin, 3<sup>rd</sup> international edition, 2004.

LENTZ, M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>

LEONARD, W. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Biotechnology Advances**, v. 49, n. May, p. 107763, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107763>

LI, H. J.; DEINZER, M. L. Structural identification and distribution of proanthocyanidins in 13 different hops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, N. 11, P. 4048-4056, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf060395r>

LI, H. et al. Antioxidant activity and typical ageing compounds: their evolutions and relationships during the storage of lager beers. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2026-2033, 2016. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13173>

MAGALHÃES, P. et al. The impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: A pilot scale approach. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 246-256, 2008. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00335.x>

MAGALHÃES, P. et al. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 19, p. 3258-3268, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.068>

MALFLIET, S. et al. Flavour instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to sensory ageing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 180-192, 2008. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00324.x>

MARCHIONI, E. et al. Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1249-1255, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104094c>

MAROVA, I. et al. Analysis of phenolic compounds in lager beers of different origin: A contribution to potential determination of the authenticity of Czech beer. **Chromatographia**, v. 73, p. 83-95, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-1916-7>

MARTINEZ, A. et al. Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 3, p. 319-327, 2017. <https://doi.org/10.1002/jib.434>

MCMURROUGH, I. et al. The role of flavanoid polyphenols in beer stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, n. 3, p. 141-148, 1996. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-54-0141>

MENDES, A. A. et al. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000500019>

MIEDL, M.; BAMFORTH, C. W. The relative importance of temperature and time in the cold conditioning of beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 62, n. 2, p. 75-78, 2004. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-62-0075>

MIKYŠHA, A. et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 1, p. 78-85, 2002. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00128.x>

MIKYŠHA, A.; krofta, k. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 3, p. 269-279, 2012. <https://doi.org/10.1002/jib.40>

MITIĆ, S. S. et al. Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 4, p. 908-922, 2014. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.680223>

MOREIRA, M. M. et al. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 382-388, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.023>

MOURA-NUNES, N. et al. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 199, p. 105-113, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, P. 95-111, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8)

NARDINI, M.; GHISELLI, A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. **Food Chemistry**, v. 84, N. 1, P. 137-143, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00257-7)

NARDINI, M.; FODDAI, M. S. Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25112466>

NARDINI, M.; GARAGUSO, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, v. 305, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>

NNS, E. et al. Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity, Color, and Free Phenolic Acid Profile of Malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6539-6546, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf0710231>

OLANIRAN, A. O. et al. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13-23, 2017. <https://doi.org/10.1002/jib.389>

PASCOE, H. M.; AMES, J. M.; CHANDRA, S. Critical Stages of the Brewing Process for Changes in Antioxidant Activity and Levels of Phenolic Compounds in Ale. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, N. 4, P. 203-209, 2004. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0203>

PEÑALVO, J. L. et al. Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9342-9347, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf051488w>

POLLOCK, B. J. R. A.; POOL, A. A.; REYNOLDS, T. Anthocyanogens in barley and other cereals and their fate during malting. **Brewing Industry Research Foundation**, v. 66, p. 389-394, 1960. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1960.tb01730.x>

POZEN, M. A. Enzymes in Brewing. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 156-164, 2015.

PRENCIPE, F. P. et al. Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus L.* **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 50-59, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097>

RODRIGUES, J. E.; GIL, A. M. NMR methods for beer characterization and quality control. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 37-45, 2011. <https://doi.org/10.1002/mrc.2844>

SAISON, D. et al. Decrease of aged beer aroma by the reducing activity of brewing yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3107-3115, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf9037387>

SAMARAS, T. S.; GORDON, M. H.; AMES, J. M. Antioxidant properties of malt model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, N. 12, P. 4938-4945, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf0501600>

SANT'ANNA, V. et al. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 3, p. 601-608, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.04.011>

SCHWARZ, K. J.; BOITZ, L. I.; METHNER, F. Release of Phenolic Acids and Amino Acids During Mashing Dependent on Temperature, pH, Time, and Raw Materials. **American Society of Brewing Chemists**, v. 70, n. 4, p. 290-295, 2012. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2012-1011-02>

SIEBERT, K.; TROUKHANOVA, N.; LYNN, P. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, P. 80-85, 1996. <https://doi.org/10.1021/jf9502459>



SILVA, C. H. P. M. **Microbiologia da Cerveja: Do básico ao Avançado**. Editora Livraria da Física, Edição 1, 2019.

SOCHA, P. et al. Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 595-609, 2017. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1306550>

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>

SZWAJGIER, D. Content of Individual Phenolic Acids in Worts and Beers and their Possible Contribution to the Antiradical Activity of Beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 243, 252, 2009. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00376.x>

SZWAJGIER, D. Dry and wet milling of malt. a preliminary study comparing fermentable sugar, total protein, total phenolics and the ferulic acid content in non-hopped worts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 569-577, 2011. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00505.x>

TAKÓ, M. et al. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 1-21, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9020165>

TIAGO, O. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 71-84, 2017. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11677>

VANBENEDEM, N. **Release of hydroxycinnamic acids and formation of flavour-active volatile phenols during the beer production process**. Dissertationes de Agricultura, Universidade de Leuven, 2007.

VANBENEDEN, N.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v.1136, n. 2, p. 237-242, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.001>

VENTURELLI, S. et al. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of câncer. **Nutrition**, v. 32, n. 11-12, p. 1171-1178, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.03.020>

VERBELEN, P. et al. Bioprocess intensification of beer fermentation using immobilised cells. **Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, p. 303-325, 2010. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_11)

WANG, J. et al. Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 23, p. 6444-6448, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601465113>

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, V. 17, N. 4, P. 953-988, 2018. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>

WUNDERLICH, S; WURZBACHER, M.; BACK, W. Roasting of malt and xanthohumol enrichment in beer. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 2, p. 137-148, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1970-5>

ZHAO, H. et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>

ZHAO, H. et al. Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 910-917, 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5824>

ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of mashing on total phenolic contents and antioxidant activities of malts and worts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 240-247, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02831.x>

## CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS ETAPAS DA PRODUÇÃO DE CERVEJA

### 2.1 INTRODUÇÃO

Algumas pesquisas têm investigado a associação do consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos com prevenção de doenças cardiovasculares, doenças relacionadas ao envelhecimento e determinados tipos de câncer, principalmente devido a ação antioxidante desses compostos (BAMFORTH, 1999). Além disso, os compostos fenólicos presentes na cerveja, auxiliam na estabilidade coloidal e no sabor, atuando no aumento da vida útil da bebida e preservando as qualidades sensoriais através da ação dos antioxidantes (ZHAO; ZHAO, 2012).

Com isso o objetivo desse trabalho foi a produção de cervejas artesanais com diferentes tipos de maltes e diferentes tipos de levedura, e assim, realizar a quantificação de compostos fenólicos totais em diferentes fases do processo de produção. Como forma de otimizar o processo, utilizou-se o melhor meio em relação à quantidade de compostos fenólicos para aplicação em dois tratamentos, um adicionando morango *in natura* e outro adicionando lúpulo pelo processo de *dry hopping*, com o intuito de obter um produto com maior teor de compostos fenólicos e conseqüentemente maior atividade antioxidante.

### 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

As produções das cervejas foram realizadas nas dependências da Cervejaria Aggregare em Uberlândia-MG e as análises foram feitas nos Laboratórios de Processos Fermentativos e Enzimáticos e nos Laboratórios didáticos do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), *campus* Patos de Minas-MG.

#### 2.2.1 Material

Foram realizadas duas etapas do processo de produção de cerveja para aumentar a quantidade e qualidade dos antioxidantes na bebida. Na etapa 1 foram produzidas em triplicata cervejas artesanais com 100% malte Pilsen de cevada, e cervejas com malte pilsen de cevada adicionadas de malte de trigo, nas proporções 50:50%. Para ambas as receitas de cerveja foram utilizadas levedura de alta fermentação POF<sup>+</sup> (WB-06) e levedura de baixa

fermentação (W34-70), conforme Tabela 2.1. Em todos os tratamentos foi utilizado o mesmo tempo de fermentação, maturação e clarificação. As amostragens foram realizadas conforme tabela 2.2.

Na etapa 2, foi utilizado o melhor meio em relação à quantidade de compostos fenólicos da primeira etapa e preparados dois tratamentos, um adicionando morango *in natura* e outro adicionando lúpulo pelo processo de *dry hopping*.

Tabela 2.1 - Identificação dos Tratamentos realizados na etapa 1 do trabalho

ETAPA	TRATAMENTOS	MALTES		LEVEDURAS		FASE FRIA	
		100% Cevada	50% cevada 50% trigo	WB06	W34/70	Morangos	Lúpulo <i>Dry Hopping</i>
1	Tratamento 1	X		X			
	Tratamento 2	X			X		
	Tratamento 3		X	X			
	Tratamento 4		X				

Tabela 2.2 – Amostragens realizadas durante a etapa 1

Amostragens
Água
Arriada (45 °C)
Após 43 °C
Após 53 °C
Após 63 °C
Após 71 °C
Ao chegar em 78 °C
Após 78 °C
Antes da fervura
Após a fervura
Após a fermentação
Após a maturação
Após a clarificação

### 2.2.1.1 Água

A água utilizada nos experimentos foi da rede de distribuição do Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) de Uberlândia-MG, passada em filtro triplo para retenção de cloro (filtro com carcaças brancas, o primeiro com elemento filtrante de polipropileno 10" x 2 ½", 5 micras, os outros dois elementos filtrantes de carvão ativado *carbon block* 10" x 2 ½", 5 micras), apresentando-se com as características físico-químicas adequadas para a elaboração da bebida.

### 2.2.1.2 Maltes

Os maltes pilsen de cevada e de trigo foram obtidos na WE consultoria sediada em Belo Horizonte-MG. As especificações técnicas de cada malte utilizado se encontram na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Especificações técnicas dos maltes utilizados para produção da cerveja

Malte	Fornecedor	Cor (EBC)	Umidade	pH	Proteínas Totais
Pilsen	BWS	4,6 - 6,4	5,1	6,9	12,6
Trigo	<i>Castle malting</i>	3,5 -5,5	5,2	6,1	13

O malte Pilsen de cevada utilizado foi o da BWS, de 2 fileiras, com cor entre 4,6 e 6,4 EBC, que foi secado em temperaturas entre 80°C a 85°C durante a malteação. Possui um sabor intenso e adocicado, além de conter bom conteúdo enzimático e suficiente para ser utilizado como malte base. Bem modificado, ou seja, não necessita de paradas proteicas ou diversas rampas de temperaturas para se aproveitar o rendimento do malte em toda sua totalidade, sendo assim, pode ser usado em infusões de temperaturas únicas (WE, 2020).

O malte de trigo utilizado foi o da Castle Malting, fabricante belga, seco a temperatura entre 80°C e 85°C durante a malteação. É essencial nas cervejas de trigo, podendo ser utilizado na proporção de até 50% da mistura. Possui proteínas de cadeias longas e médias, que proporcionam à cerveja uma sensação de corpo e aprimora a estabilidade da espuma da cerveja (WE, 2020).

### 2.2.1.3 Lúpulo

O lúpulo utilizado foi o Hallertal Hersbrucker, do fabricante alemão BarthHaas, comprado na LNF Latino Americana em embalagens de 50 gramas. As informações técnicas do mesmo encontram-se na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Informações técnicas do lúpulo Hallertal Hersbrucker utilizado no trabalho

<b>Hallertal Hersbrucker</b>	
<b>Fabricante: BarthHaas</b>	
<b>Safra 2019 Lote 19-983</b>	
Alfa Ácidos	3,30%
Beta Ácidos	2,5 - 60%
Cohumulona	17 - 25%
Polifenóis	5 - 6%
Óleos Totais	0,5 - 1 mL/100g
Mirceno	15 - 30%
Linalol	0,5 - 1%
Humuleno	20 - 30%
Cariofileno	8 - 13%
Farneseno	< 1%

### 2.2.1.4 Leveduras

As leveduras liofilizadas utilizadas foram a *WB-06* (Alta fermentação e POF<sup>+</sup>) e a *W34/70* (Baixa fermentação), ambas produzidas pela empresa *Fermentis* e foram obtidas na WE consultoria localizada em Belo Horizonte - MG.

A SafAle™ WB-06 (*Saccharomyces cerevisiae*) é uma levedura alemã selecionada especialmente para produzir cervejas de trigo. Traz notas esterificadas e fenólicas, típicas desse estilo. Deve ser dosada entre 50 a 80 g/hL, conforme indicação do fabricante. Trabalha idealmente entre 18 e 24°C. (WE, 2020).

A SafAle™ W34-70 (*Saccharomyces pastorianus*) é uma levedura alemã que produz um caráter sensorial neutro e limpo à cerveja. Deve ser dosada entre 90 a 120 g/hL,

idealmente entre 12 e 15 °C. (WE, 2020).

#### 2.2.1.5 Adição de Morango

Na segunda etapa do trabalho a fruta adicionada na cerveja foi o morango. Adquiriu-se as frutas na sua forma inteira e congelada na Brasfrut, empresa situada na cidade de Uberlândia-MG. A quantidade de morangos adicionada foi de 100g/L de cerveja no terceiro dia da fermentação. Preparou-se uma polpa processando os morangos já descongelados em um Master Suco com a intenção de aumentar a superfície de contato. Escolheu-se essa fruta baseado em estudos que mostram o seu excelente sabor e aceitação por uma ampla gama de consumidores e ao seu alto teor de compostos bioativos (SALAZAR-ORBEA et al., 2023) (ESTEVES; HELENA; MARIA, 2007).

As frutas podem ser adicionadas durante o processo de fervura, fermentação ou maturação. Adicionar durante a fervura pode trazer amargor ou turbidez, pois pode liberar pectina. Outro complicador é que a sutileza de aromas podem ser volatilizados devido a exposição a altas temperaturas (GASINSKI et al., 2020). Adicionar durante a maturação pode deixar açúcares residuais no produto final, que podem ser refermentados pela levedura presente e o risco de super-carbonatação é muito alto, apesar de que dentre todas possibilidades é a que maior transfere aromas a cerveja. Martinez et al. (2017) citou em seu trabalho que o açúcar das frutas desencadeia uma fermentação secundária e os sabores das frutas são extraídos lentamente de sua polpa sólida. A adição nesse momento, ao contrário de se adicionar na fervura, tem como benefícios o incremento de sabor e aromas devido aos compostos voláteis da fruta fresca, assim como a preservação de alguns compostos fenólicos que perdem sua estabilidade em temperaturas mais altas. Devido a isso optou-se por adicionar no terceiro dia de fermentação, pois isso promove o consumo dos açúcares da fruta, pela levedura, e mantém melhor o aroma e sabor visto que não há altas temperaturas envolvidas no processo (MARTÍNEZ et al., 2017).

#### 2.2.1.6 Dry hopping

Na segunda etapa do trabalho o lúpulo utilizado para realização do *dry hopping* foi o Hallertal Hersbrucker, comercializado pela LNF Latina Americana, produzido pela Haas. É o mesmo lúpulo adicionado na etapa de fervura em todos os tratamentos, porém nessa técnica



o lúpulo é adicionado dentro do fermentador após a etapa de fermentação. Optou-se por utilizar o mesmo lúpulo com o intuito de avaliar o processo e não a matéria-prima.

O *dry hopping* é uma tecnologia onde cones de lúpulo inteiros, lúpulo moído ou *pellets* são adicionado à cerveja gelada para transferir os componentes do sabor específico para cerveja com baixas perdas (sem evaporação) e transformações químicas reduzidas (sem carga térmica, menos influência de levedura). Essa técnica de lupulagem é usada principalmente para fornecer aroma e sabor intensos de lúpulo à cerveja, mas visto que o lúpulo é rico em polifenóis e íons metálicos, a dissolução parcial desses compostos do lúpulo na cerveja durante o *dry hopping* pode afetar a estabilidade oxidativa da cerveja (HAUSER; LAFONTAINE; SHELLHAMMER, 2019). Hrabia et al. (2022) fizeram um estudo sobre os efeitos da temperatura de *dry hopping* na estabilidade oxidativa e potencial antioxidante da cerveja, e os testes realizados a 20 °C foram os que apresentaram melhores resultados. Devido a isso optou-se por adicionar 10 g/L de lúpulo ao final da fermentação e deixar por 3 dias na temperatura de 20 °C.

## 2.2.2 Metodologia

### 2.2.2.1 Fabricação das cervejas

Para o preparo das cervejas foi utilizada uma panela automática de inox tipo *single vessel* com capacidade para produzir 30 litros de mosto cervejeiro, e o processo foi feito na cervejaria Aggregare de Uberlândia-MG.

A panela *single vessel* (ou “único recipiente”) é um equipamento usado na produção de cerveja que combina várias etapas do processo de produção em um único recipiente. É projetado para simplificar o processo de brassagem e fervura do mosto, pois possui um cesto com fundo falso que permite que o bagaço seja erguido e separado do mosto para realizar a lavagem dos grãos e iniciar a fervura sem a necessidade de transferir o mosto para outro recipiente. Possui aquecimento elétrico e controlador de temperatura digital que permite programar o tempo e a temperatura das etapas de brassagem. Possui embutida uma bomba de recirculação que permite recircular o mosto durante a brassagem e melhorar a eficiência na extração dos açúcares, assim como a clarificação do mosto antes da lavagem do bagaço e posterior fervura.

A água utilizada foi da rede de distribuição do DMAE, passada em filtro triplo para

retenção de cloro (filtro com carcaças brancas, o primeiro com elemento filtrante de polipropileno os outros dois elementos filtrantes de carvão ativado carbon block) e os os maltes foram moídos a seco, em moinho de 3 rolos, verificando-se a integridade das cascas e o tamanho dos fragmentos do endosperma.

Adicionou-se 27 litros de água dechlorada na panela e iniciou-se o aquecimento da água. Quando a água atingiu 43 °C foi adicionado 6 quilos de malte moído e manteve-se sob recirculação durante todo o processo de mosturação. As temperaturas da brassagem foram estabelecidas de acordo com trabalhos já realizados em outros estudos e que apresentaram melhor resultado de teor de fenólicos (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018). As rampas de temperatura utilizadas foram: 15 minutos a 43°C, 15 minutos a 53°C, 30 minutos a 63°C, 30 minutos a 71°C e 10 minutos a 78°C. Ao final da mosturação, para extrair o açúcar remanescente no bagaço do malte, ergueu-se o cesto com fundo falso e lavou-se com 14 L de água aquecida previamente até 78°C. Retirou-se o cesto e iniciou-se a fervura que durou 60 minutos. Aos 10 minutos de ebulição, foi adicionado 40 g de lúpulo para conferir amargor à cerveja, e ao final da fervura, ao desligar o fogo, foi adicionado 10 g de lúpulo de aroma e sabor. Foi realizado o wirpool por 2 minutos, e aguardou-se 15 minutos para a sedimentação do trub.

A temperatura do mosto foi reduzida através de um trocador de calor de placas. Concluído o processo de resfriamento, os mostos foram acondicionados em baldes brancos tipo Alimentar com capacidade de 12 litros para a fermentação primária (4 litros de mosto em cada). Para a inoculação, foi adicionado 2,0 g de levedura SafAle WB06 no momento em que o mosto de 3 fermentadores atingiu a temperatura de fermentação de 20 °C para os Tratamentos 1 (feito com 100% malte pilsen de cevada) e 3 (feito com adição de 50% de malte de trigo a 50% de malte pilsen de cevada), e adicionado 4 g de levedura SafLager W34-70 quando a temperatura do mosto de outros 3 fermentadores atingiu a temperatura de 12 °C para os Tratamentos 2 (feito com 100% malte pilsen de cevada) e 4 (feito com adição de 50% de malte de trigo a 50% de malte pilsen de cevada). Após 10 dias de fermentação, as cervejas foram levadas para a maturação por 10 dias nas temperaturas de 12 e 4°C (alta e baixa fermentação, respectivamente). Posteriormente essas cervejas foram submetidas à clarificação por 10 dias em temperatura de 1 °C. Não foi feito a carbonatação no final do processo visto que para as análises seria necessário descarbonatar as amostras.

Na segunda etapa deste trabalho, no tratamento 5, o morango foi adicionado no

terceiro dia de fermentação. Já o *dry hopping* foi feito após o sétimo dia de fermentação no tratamento 6. Após o final da fermentação os 2 testes foram submetidos à maturação por 10 dias e clarificação por 10 dias.

#### 2.2.2.2 Análises físico-químicas

Na primeira etapa do trabalho foram coletadas amostras desde a produção da cerveja até o produto final para análises de pH, densidade, açúcares e determinação do teor de compostos fenólicos totais (Singleton e Rossi, 1965), as quais são detalhadas nos subtópicos a seguir. Após selecionar a melhor amostra de acordo com os resultados obtidos, seguiu-se para a segunda etapa do trabalho, e além dessas análises realizadas acima foram avaliados também a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH<sup>+</sup>, ABTS. Foram analisadas amostras de cada etapa da mosturação dos mostos obtidos com malte de cevada Pilsen e malte de cevada Pilsen adicionado de malte de trigo. Ambos fermentados com levedura Ale POF (WB06) e levedura Lager (W34/70), após as etapas de fermentação, maturação e clarificação.

##### 2.2.2.2.1 Densidade por refratômetro

O refratômetro mede a refração da luz que atravessa uma solução. Quanto mais densa a solução, menos luz passa e maior é a refração. Assim como densímetros, os refratômetros manuais também são calibrados a partir de soluções de sacarose a determinada temperatura (usualmente 20°C). A escala de refração está em percentagem de extrato, grau Brix (°Bx). Onde 1°Bx corresponde a 1% (g/g) de sacarose aparente em água. Entretanto, o mosto e a cerveja não são compostos apenas de sacarose, mas de diversos açúcares que têm índices de refração diferentes da sacarose. É usual aos cervejeiros utilizarem a escala em grau Plato (°P), que abrange a percentagem de sólidos dissolvidos em água, mas existem equipamentos atuais que permitem a visualização da densidade em °Bx, °P, e em g/cm<sup>3</sup>.

Para a análise dos sólidos solúveis do mosto utilizamos um Refratômetro Marca Contec de escala dupla. Colocamos duas gotas do mosto no prisma do refratômetro e a linha na cor azul indicou a leitura do percentual de extrato em ° brix e a densidade em g/cm<sup>3</sup> (AOAC, 2015).

#### 2.2.2.2.2 pH

A análise do pH das cervejas foi realizada em medidor de pH (potenciômetro), Marca Akso, Modelo K95 (AOAC, 2015). Adicionou-se 30 mL da cerveja em béquer, emergiu-se o pHmetro nas amostras de cerveja até fixar o valor do pH no visor digital e, realizou-se a leitura das amostras.

#### 2.2.2.2.3 Determinação do teor de fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Essas análises foram realizadas nos Laboratórios de Engenharia de Alimentos da UFU.

Reagiu-se 0,50 mL das amostras do processo de fabricação da cerveja com 2,5 mL de 0,2 mol L<sup>-1</sup> do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L<sup>-1</sup>) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) no comprimento de onda de 760 nm, após incubação à temperatura ambiente durante por 2 h. O ácido gálico (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg mL<sup>-1</sup>) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 2.2.2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH<sup>•</sup>

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia de Lopes-Lutz et al. (2008), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL das amostras do processo de fabricação da cerveja. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a Equação 2.1:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100 \quad (\text{Equação 2.1})$$

Em que:

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

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

#### 2.2.2.2.5 Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes et al. (2010). Para o ensaio foram misturados 10 µL mL das amostras das etapas do processo de fabricação das cervejas e 990 µL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. A absorbância foi monitorada por leitura em espectrofotômetro (Gehaka UV-340G) a 735 nm, durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS<sup>•+</sup> foi utilizada como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (AA%) pelas amostras foi calculada de acordo com a Equação 2.2:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] * 100 \quad (\text{Equação 2.2})$$

Em que:

$A_{CN}$  = Absorbância do controle negativo

$A_{Am}$  = Absorbância da amostra

#### 2.2.2.2.6 Determinação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As concentrações de açúcares (glicose, frutose, sacarose e maltose) e etanol e glicerol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Diluiu-se 1 mL de cada amostra em balão volumétrico de 25 mL, posteriormente foram filtradas e injetadas no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Prominence, com coluna C610H, na qual os componentes são separados, além disso, utilizou-se um detector de índice de

refração. A fase móvel utilizada foi água acidificada com ácido ortofosfórico na vazão de 0,5 mL/min e a temperatura do forno foi de 32°C,

#### 2.2.2.2.7 Análise estatística

Para a avaliação dos dados do teor de fenólicos totais da etapa 1 o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 7 tempos de retirada do mosto (Arriada; Mosturação após 43°C, após 53°C, após 63°C, após 71°C e após 78°C; fervura) com 3 repetições. Isso ocorreu para o mosto da cerveja com malte Pilsen (Tratamentos 1, 2) e do mosto da cerveja com malte pilsen mais malte de trigo (Tratamentos 3 e 4) antes da fermentação. Após esse procedimento os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (3 X 2), sendo 3 tempos de coleta (fermentação, maturação e clarificação) e duas leveduras (WB06 e W34/70) com 3 repetições.

Já para a avaliação dos dados do teor de fenólicos totais, atividade antioxidante método DPPH e ABTS da etapa 2, os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 32 tempos de retirada do mosto com 3 repetições.

O programa estatístico utilizado foi o sistema de análise de variância para dados balanceados – SISVAR (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de equivalentes ao ácido gálico expressos em miligramas de ácido gálico (MG GAE) por litro da cerveja. O software empregado foi o GRAFHPAD PRISM.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente serão apresentados os resultados da primeira etapa do trabalho durante todo o processo de fabricação da cerveja até obtenção do produto final (Tratamentos 1 a 4).

Para a segunda etapa do trabalho foram realizados tratamentos com o malte e a levedura do Tratamento da etapa 1 que apresentou melhor resultado de teor de fenólicos, fazendo o acréscimo de fruta e *dry hopping* no estágio da fermentação, para finalmente comparar os resultados (Tratamentos 5 e 6).

### 2.3.1 Etapa 1

As amostragens durante a fabricação das cervejas na etapa 1 ocorreram conforme tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Amostragens realizadas na etapa 1 do trabalho

<b>Amostragens</b>
Água
Arriada (45 °C)
Após 43 °C
Após 53 °C
Após 63 °C
Após 71 °C
Ao chegar em 78 °C
Após 78 °C
Antes da fervura
Após a fervura
Após a fermentação
Após a maturação
Após a clarificação

#### 2.3.1.1 Análises do pH, densidade e açúcares durante o processamento da cerveja

Na Figura 2.1 observa-se o comportamento do pH durante o processamento das cervejas realizadas na primeira etapa. Durante a mosturação, observou-se uma queda do pH no momento da arriada, pois nesta etapa ocorre a inserção do malte e este possui uma composição química de sais que promovem um efeito tampão no mosto (BARTH, 2013). Nota-se que o pH da água inicial dos tratamentos 1 (100% malte pilsen de cevada e levedura WB06) e 2 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70) diferem dos tratamentos 3 (50% malte pilsen de cevada e 50% malte de trigo e levedura WB06) e 4 (50% malte pilsen de cevada 50% malte de trigo e levedura W34/70), mas durante a arriada o pH dos quatro tratamentos caíram para o mesmo valor de 5,81.

Ocorreram poucas variações de pH durante a mosturação em todos os tratamentos, porém verificou-se uma queda relativamente maior do pH nos tratamentos 1 (100% malte pilsen de cevada e levedura WB06) e 2 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70). Além disso, foi possível perceber o efeito das leveduras nos processos fermentativos, sendo que nas fermentações com a levedura para altas fermentações WB06 (Tratamentos 1 e 3), observou-se uma redução de pH mais acentuada do que com o uso da levedura W34/70 (Tratamentos 2 e 4). Após 60 horas de fermentação, o pH dos 4 tratamentos ficou inalterado até o final do processo produtivo da cerveja. A queda dos pHs nos primeiros dias de fermentação era esperada devido à formação de ácidos voláteis (ácido acético e ácido fórmico) e ácidos não voláteis (pirúvico, málico, cítrico e succínico) que ocorrem nesse período de fermentação. (MARTÍNEZ et al., 2017) encontraram comportamento semelhante de queda de pH após 24 horas de fermentação.

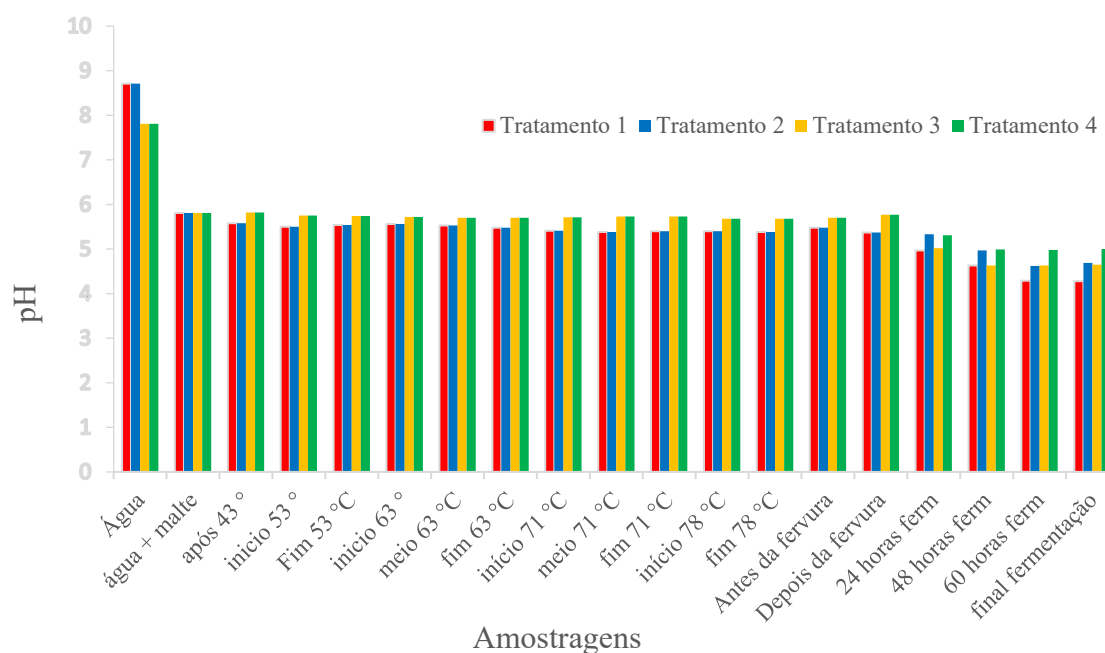


Figura 2.1 – Comparação dos pHs dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 durante o processamento da cerveja

Além disso, foi possível perceber o efeito das leveduras nos processos fermentativos, sendo que nas fermentações com a levedura para altas fermentações WB06, observou-se uma redução de pH mais acentuada do que com o uso da levedura W34/70. Após 60 horas



de fermentação, o pH de todos os tratamentos ficou inalterado até o final do processo produtivo da cerveja.

Na Figura 2.2 observa-se a densidade do mosto durante a o processo de mosturação dos tratamentos 1, 2, 3 e 4.

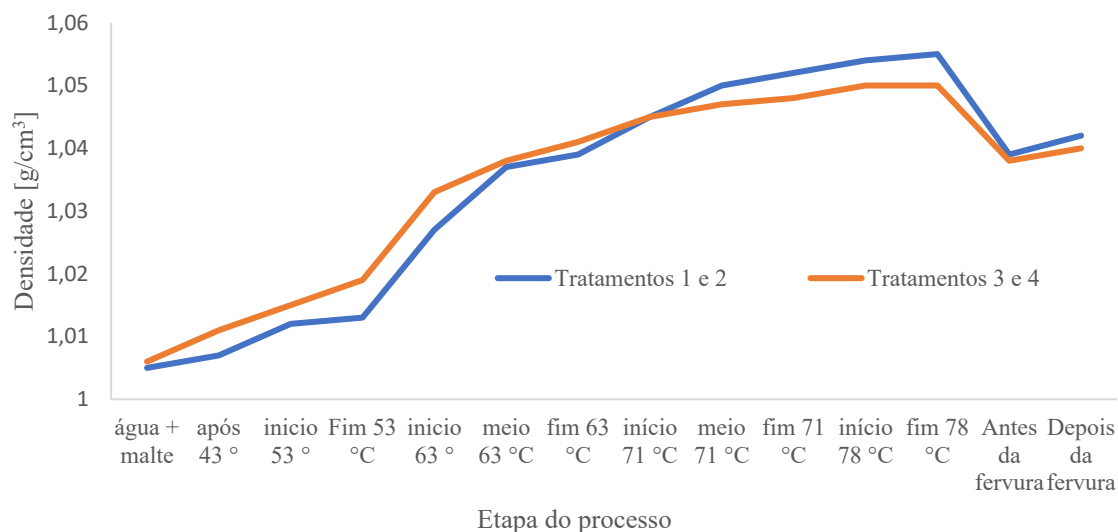


Figura 2.2 - Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) durante o processamento dos mostos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4.

O controle de temperatura é de particular interesse no processo de fabricação de cerveja porque baixas temperaturas podem não ativar as enzimas e altas temperaturas podem inativá-las. Além disso, é importante ressaltar que o aumento da temperatura pode contribuir para a polimerização e também afetar o processo de clarificação do *wirlpool* (DE ALMEIDA et al., 2018b).

Durante a mosturação, a hidrólise enzimática degrada o polissacarídeo do amido presente nos grãos de malte, produzindo carboidratos fermentáveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose. As rampas de temperatura foram feitas com intuito de gerar os açúcares e liberar os compostos fenólicos presentes no malte. São as rampas de temperatura que solubilizam os carboidratos e ativam as enzimas com o intuito de quebrar as macromoléculas (DE ALMEIDA et al., 2018a).

As atividades das enzimas necessárias para produzir esses compostos são altamente dependentes da temperatura (POZEN, 2015). Avaliando a curva das densidades dos tratamentos observa-se a presença de açúcares já após a arriada, esses açúcares são provenientes das matérias-primas, visto que durante o processo de malteação, ocorre a

síntese de algumas enzimas, a quebra da parede do endosperma e da matriz proteica, permitindo o acesso aos grânulos de amido. Dessa forma, já ocorre a formação de alguns açúcares durante a fase da germinação, permitindo a percepção da presença dos mesmos já no início do processo de mostura, mesmo antes das enzimas amilolíticas atuarem (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018). Comparando os tratamentos a densidade ficou muito próxima entre eles.

Avaliando as Figuras 2.3 e 2.4 pode-se observar a formação dos açúcares, analisadas por cromatografia, de acordo com as rampas de temperatura utilizada no processo de mosturação. Segundo Mekonnen (2013), o programa de temperatura durante a maceração do malte é normalmente projetado para favorecer as enzimas que degradam o amido, a fim de maximizar o rendimento do extrato e a formação de açúcares fermentáveis. Durante a malteação a enzima  $\beta$ -amilase é ativada, enquanto a enzima  $\alpha$ -amilase é formada. Devido à disponibilidade de substratos presentes no grão açúcares e dextrinas são geradas, explicando a presença de maltose e glicose já na etapa de arriada. Porém, a presença da enzima maltase no malte também pode fazer com que haja a degradação de maltose em glicose em temperaturas próximas a 30°C, o que pode justificar o aumento de glicose entre a arriada e após a rampa de 43 °C (KUNZE, 2004).

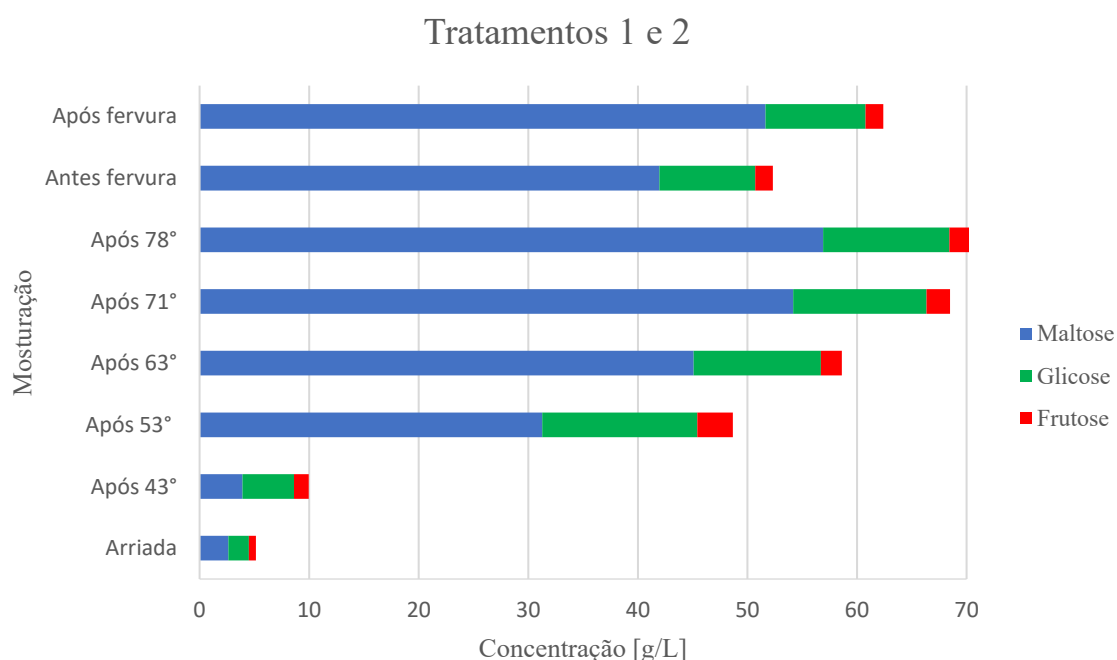


Figura 2.3 - Açúcares formados durante a mostura dos Tratamentos 1 e 2, com 100% de malte pilsen de cevada.

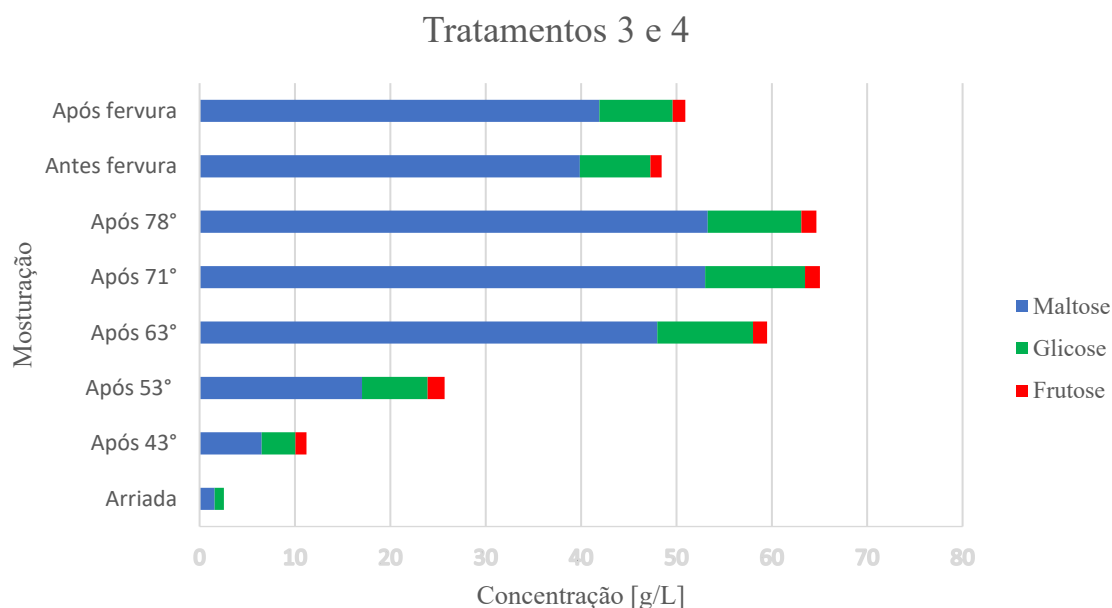


Figura 2.4 - Açúcares formados durante a mostura dos Tratamentos 3 e 4, com 50% malte pilsen de cevada e 50% malte de trigo.

Observou-se a presença de frutose apenas nos tratamentos 1 e 2, feitos com 100% de malte pilsen de cevada. A frutose é tradicionalmente produzida a partir da hidrólise do amido em 3 etapas enzimáticas sucessivas que envolvem  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e glicose isomerase, ou a partir da hidrólise da sacarose pela invertase, obtendo-se uma mistura final de glicose e frutose na proporção 50:50 (PORTES, 2005). Hangenaeken (2020) encontrou no malte de cevada valores de glicose, frutose e maltose nas quantidades 2,2 g/100g, 0,3 g/100g e 2,9 g/100g respectivamente. Segundo ele o frutano está presente no grão de cevada maduro entre 0,75 e 4,2% do peso do grão seco. Tem sido sugerido que esse teor aumenta durante a malteação da cevada. Ele é um oligômero de frutose com apenas uma ou nenhuma unidade de glicose e pode ser hidrolisado por invertases para formar sacarose, frutose ou glicose.

Após a rampa de 43°C já se observou um incremento na formação de maltose, glicose e frutose. Isso pode ser explicado pelo fato de que nesta temperatura, há a ativação da  $\alpha$ -glicosidase que quebra o amido em maltose e dextrina, entre outros açúcares (UCHIDA et al., 1991).

Após a rampa de 53 °C observou-se o maior incremento de maltose durante todo o processo de mostura. Além de estar numa temperatura próxima à temperatura ótima da enzima dextrinase limite, enzima desramificadora que ataca as ligações  $\alpha$  (1,6) da amilopectina, isso favorece estericamente a ação da  $\beta$ -amilase (POZEN, 2015). A  $\beta$ -amilase produz maltose a partir de extremidades não redutoras das dextrinas, apesar de possuir atividade ótima entre 60 e 65 °C, já possui atividade em temperaturas próximas a 55 °C. Sua ação continuou durante a rampa de 63 °C. (UCHIDA et al., 1991). Ela é degradada rapidamente em temperaturas acima de 70 °C. Apesar da  $\alpha$ -amilase trabalhar em temperaturas ótimas de 70 a 72 °C, sua ação se inicia a partir de 65 °C (POZEN, 2015), o que justifica os teores de glicose estabilizarem ao atingir a rampa de 71 °C. A queda dos açúcares na etapa antes da fervura se deve ao enxágue do bagaço feito com água a 78 °C, o que gera a diluição do mosto. Após a fervura os níveis de açúcares voltam a aumentar visto que houve a evaporação da água e concentração do mosto (POZEN, 2015).

Observou-se comportamento semelhante no mosto dos Tratamentos 3 e 4, com 50% malte pilsen de cevada e 50% malte de trigo, porém os teores dos açúcares foram mais baixos que os observados no mosto dos Tratamentos 1 e 2 (100% malte pilsen de cevada).

Nos dois mostos a maltose se apresentou em maior concentração, seguida da glicose e frutose. Isso também foi observado por De almeida et al. (2018b) e Fox et al. (FOX et al., 2019). Isso é positivo, visto que tanto a frutose quanto a glicose são preferencialmente consumidos pela levedura no processo de fermentação, e até que o consumo desses açúcares atinja aproximadamente 50%, o consumo de outros açúcares, como a maltose (o principal açúcar presente), é reprimido. Portanto, altas concentrações de glicose e frutose podem ser um fator negativo no processo de fabricação de cerveja (PRATT; BRYCE; STEWART, 2003).

### *2.3.1.2 Análise dos compostos fenólicos*

As Figuras 2.5 e 2.6 mostram os teores de fenólicos após a fermentação, após a maturação e após clarificação (produto final). Já após a fermentação observou-se uma queda nos teores de fenólicos dos tratamentos 1 (100% malte pilsen de cevada e WB06) e tratamento 2 (100% malte pilsen de cevada e W3470) com relação ao mosto original. Este, preparado somente com malte pilsen de cevada, apresentava um valor de 409 mg EAG/L antes das fermentações, e as cervejas obtidas nos Tratamentos 1 e 2 (amostras após a

clarificação fermentadas com leveduras WB06 e W3470 respectivamente) apresentaram um teor de fenólicos totais de 342 mg EAG/L e 392 mg EAG/L. Apesar de ocorrer a liberação de ácidos fenólicos ligados pela levedura durante o processo fermentativo, sua queda após a fermentação pode ser devido à adsorção ocorrida pelo trub frio e também pela levedura (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

O mesmo ocorreu nas cervejas produzidas pelos tratamentos 3 (50% malte pilsen de cevada e 50% malte de trigo e WB06) e tratamento 4 (50% malte pilsen de cevada e 50% malte de trigo e W34/70), apesar da queda ter sido mais significativa nesses 2 últimos tratamentos. O mosto original produzido com malte pilsen de cevada adicionado de malte de trigo na proporção de 50% apresentou teor de fenólicos 427 mg EAG/L, enquanto as cervejas dos Tratamentos 3 e 4 (amostras após a clarificação fermentadas com leveduras WB06 e W3470 respectivamente) apresentaram um teor de fenólicos totais de 275 mg EAG/L e 281 mg EAG/L. Essa mesma queda de teor de compostos fenólicos foi observada por (SZWAJGIER, 2009; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018; ZHAO, 2015) em estudos onde compararam o teor destes compostos no mosto e nas cervejas obtidas.

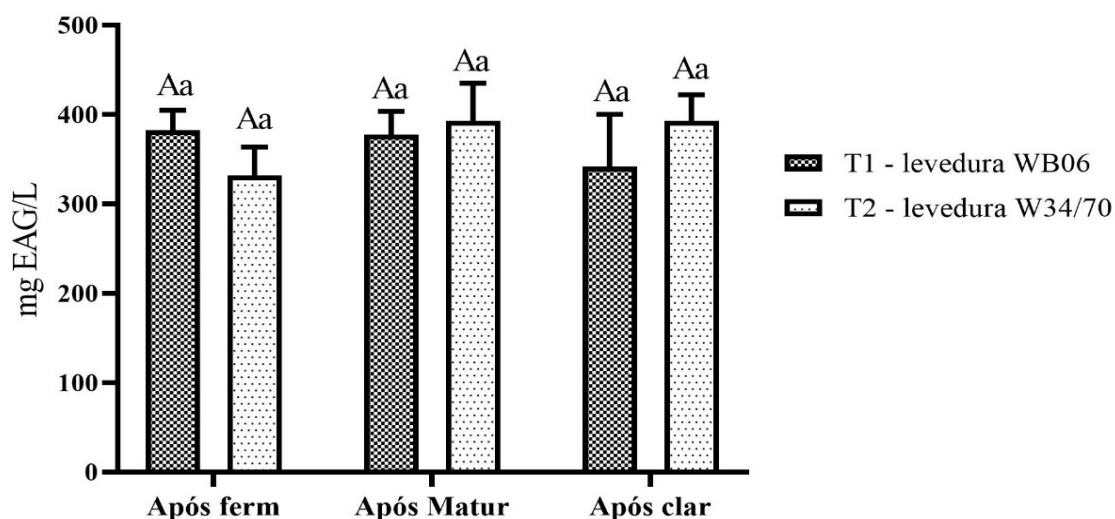


Figura 2.5 - Teor de compostos fenólicos totais dos Tratamentos 1 e 2 (Cervejas com 100% malte Pilsen) utilizando 2 leveduras (WB06 e W3470).

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

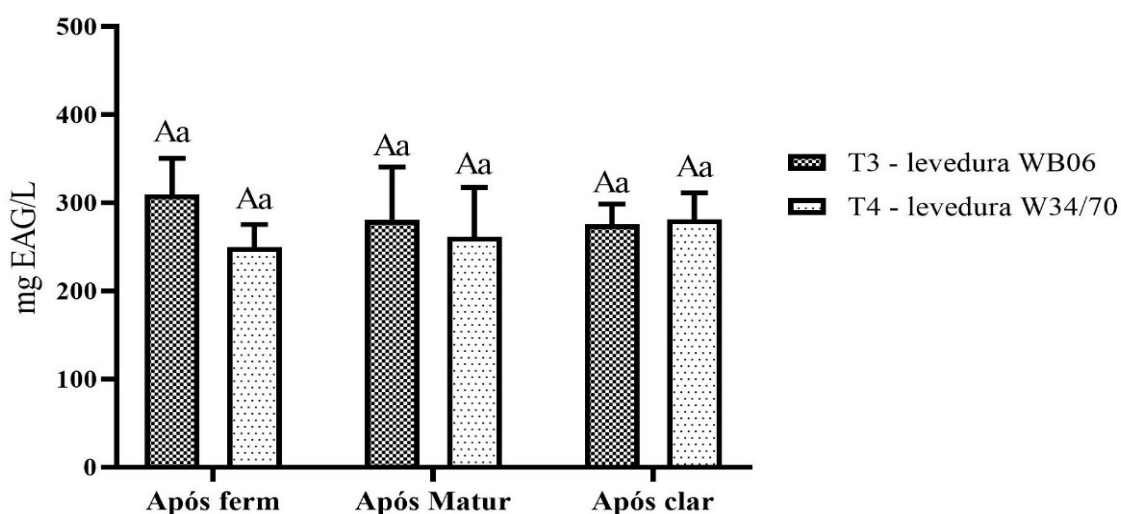


Figura 2.6 - Teor de compostos fenólicos totais dos Tratamentos 3 e 4 (Cervejas com malte de cevada adicionadas de malte de trigo na proporção 50:50) utilizando 2 leveduras (WB06 e W3470).

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

Para os compostos fenólicos todos os tratamentos apresentaram bons resultados, mas os Tratamentos 1 e 2 apresentaram valores mais elevados no produto final que os Tratamentos 3 e 4. Como não houve diferença significativa de teor de compostos fenólicos entre os Tratamentos 1 e 2, optou-se por seguir para a etapa 2 com o Tratamento 2 onde utilizou-se apenas malte pilsen, por ser mais barato que o malte de trigo e Levedura W34/70, por ser uma levedura que produz cervejas sensorialmente mais neutras onde o morango e o *dry hopping* podem se destacar mais.

### 2.3.2 Etapa 2

Na etapa 2, o morango foi adicionado após o terceiro dia de fermentação e lúpulo por *dry hopping* ao final de 7 dias de fermentação, com intuito de evitar perdas durante o processamento da cerveja e assim acrescentar conteúdo fenólico e enriquecer a composição de bioativos na cerveja, aumentando sua vida de prateleira e rendendo saudabilidade ao

consumidor. A tabela 2.5 mostra a identificação dos Tratamentos da etapa 2 e a tabela 2.6 os pontos de amostragem realizados pra essa etapa.

Tabela 2.5 – Identificação dos Tratamentos realizados na etapa 2 do trabalho

ETAPA	TRATAMENTOS	MALTES		LEVEDURAS		FASE FRIA	
		100% Cevada	50% cevada 50% trigo	WB06	W34/70	Morangos	Lúpulo <i>Dry Hopping</i>
2	Tratamento 5	X			X	X	
	Tratamento 6	X			X		X

Tabela 2.6 – Amostragens realizadas na etapa 2 do trabalho

Amostragens
Água
Arriada (45 °C)
Após 43 °C
Após 53 °C
Após 63 °C
Após 71 °C
Ao chegar em 78 °C
Após 78 °C
Antes da fervura
Após a fervura
Após 3 dias de fermentação
Ao final da fermentação
Após a maturação
Após a clarificação

### 2.3.2.1 Análises do ph, densidade e açúcares dos Tratamentos 5 e 6

Na Figura 2.7 observa-se o comportamento do pH durante o processamento das cervejas na segunda fase, nos tratamentos 5 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70 com adição de morangos) e 6 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70 com adição de lúpulo por *dry hopping*).

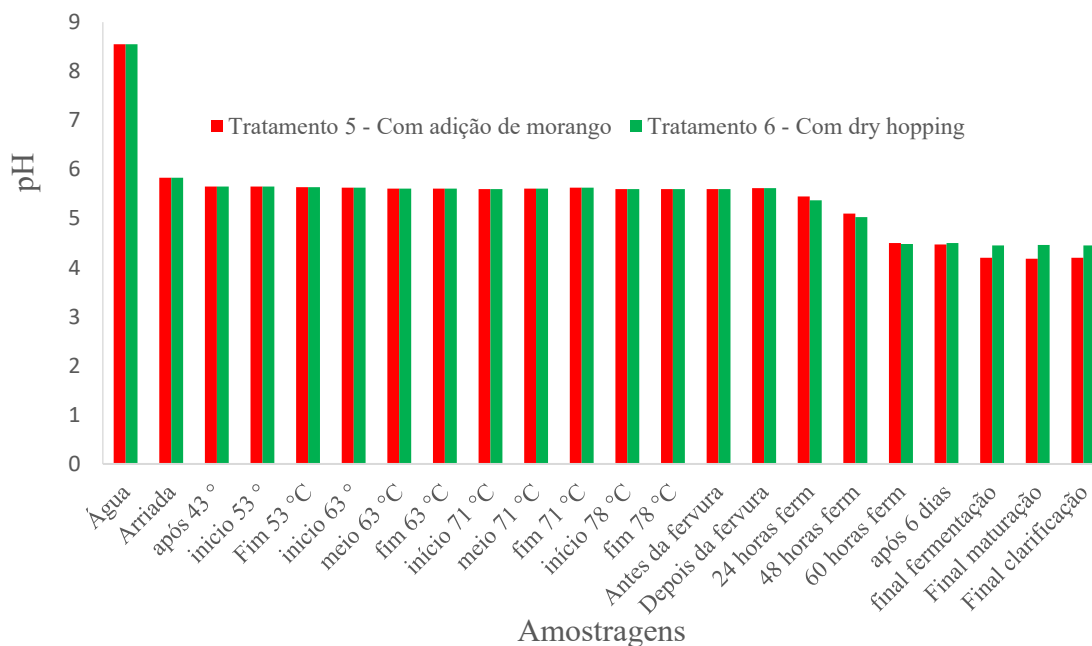


Figura 2.7 - Comparação do pH dos tratamentos 5 e 6 durante o processo produtivo da cerveja

O valor do pH cai a partir das 24 horas de fermentação, depois se torna constante. Essa queda pode ser devido à formação de ácidos voláteis (ácido acético e ácido fórmico) e ácidos não voláteis (pirúvico, málico, cítrico e succínico) (MARTÍNEZ et al., 2017). Este fato também foi observado neste trabalho, pois observou-se uma queda do pH pós 24 horas de fermentação em todos tratamentos e nas duas etapas.

O pH final das cervejas com 100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70 (tratamento 2) foi de 4,64. Já nas cervejas com 100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70 com adição do morango (tratamento 5) o pH final encontrado foi de 4,20. Essa queda era esperada, visto que a adição de frutas geralmente leva a um declínio do pH porque as frutas possuem muitos ácidos orgânicos (SARANRAJ; SIVASAKTHIVELAN; NAVEEN, 2017). Segundo Li e Liu (2015) geralmente, o pH da cerveja comum está entre 4,0 e 5,5, já para cervejas de frutas o pH está entre 3,8 a 4,4. Jung et al. (2017) adicionou diferentes tipos de pêssegos em cervejas, e todos os testes com adição de pêssego apresentaram valores de pH mais baixos que a amostra controle de cerveja sem adição da fruta, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

A Tabela 2.7 mostra o pH de algumas cervejas produzidas com adição de frutas já citadas por outros autores. Kim et al. (KIM et al., 2017) encontraram o pH de 4,10 em uma



cerveja adicionada de pêssego, esse valor está próximo ao encontrado na cerveja adicionada de morango onde o pH encontrado foi 4,2. Essa diferença encontra-se dentro da normalidade visto que o tipo de fruta (NARDINI; GARAGUSO, 2020) e a quantidade de fruta (JUNG et al., 2017) adicionada impactam diretamente no valor de pH do produto final.

Tabela 2.7 - pH de cervejas produzidas com frutas

Cerveja	pH	Referência
Cerveja comum	4,00 a 5,50	(LI; LIU, 2015)
Cerveja com pêssego	3,81 a 4,10	(KIM et al., 2017) (KAWA-RYGIELSKA et al., 2019)
Cerveja com cerejas	3,43 a 3,71	(GASINSKI et al., 2020)
Cerveja com manga	3,58 a 3,77	(ORSI, 2022)
Cerveja com maracujá	3,65 a 3,95	(GASINSKI et al., 2020)
Cerveja com abacaxi	3,9	(GASINSKI et al., 2020)

Para o tratamento 6 não se observou diferença significativa de pH proveniente do *dry hopping*

A figura 2.8 mostra a evolução da densidade durante a mosturação dos Tratamentos 5 e 6 comparada à densidade do Tratamento 2, usado como referência para a segunda etapa do trabalho.

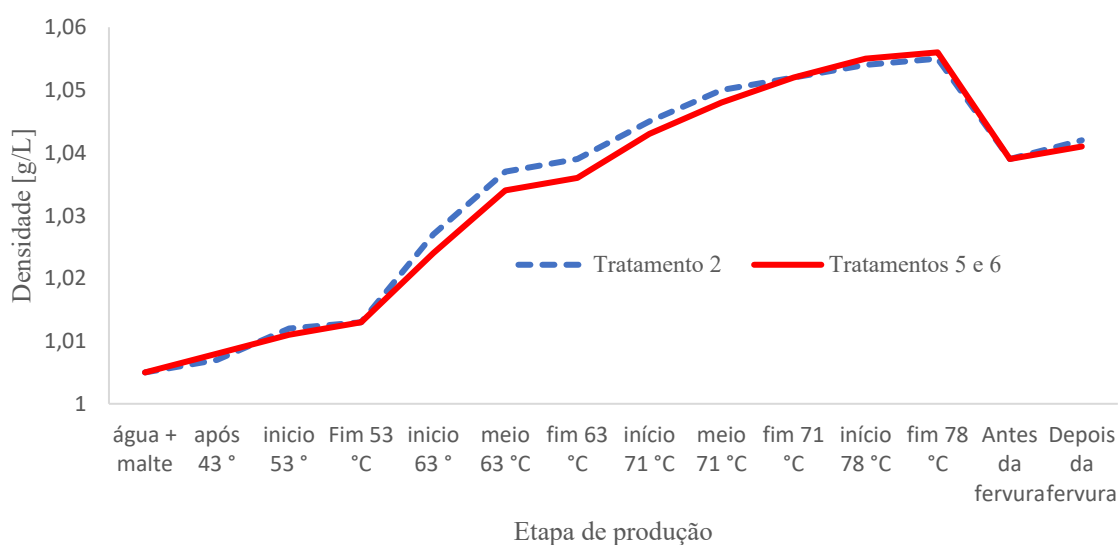


Figura 2.8 - Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) durante o processamento dos mostos dos Tratamentos 2, 5 e 6.

A densidade do mosto dos Tratamentos 5 e 6 feito com 100% de malte pilsen de cevada apresentou comportamento muito semelhante à densidade do mosto do Tratamento 2. Isso era esperado visto que foi uma repetição do teste executado já na primeira etapa do trabalho. Observou-se um incremento da densidade até a inativação enzimática, com queda após a lavagem do bagaço que causou uma diluição dos açúcares, com novo incremento após a fervura devido à concentração de açúcares causado pela evaporação (POZEN, 2015).

Na figura 2.9 pode-se observar a formação dos açúcares dos Tratamento 5 e 6, analisadas por cromatografia, de acordo com as rampas de temperatura utilizada no processo de mosturação.

O gráfico dos açúcares do mosto dos Tratamentos 5 e 6 feitos com 100% de malte pilsen de cevada apresentou mesmo comportamento que os açúcares no mosto do Tratamento 2, isso era esperado visto que foi uma repetição do Tratamento 2 feito na primeira etapa do trabalho.

A Figura 2.10 mostra o teor de compostos fenólicos totais dos Tratamentos 5 (100% malte pilsen, levedura W34/70 e adição de morangos) e Tratamento 6 (100% malte pilsen, levedura w34/70 e adição de lúpulo por *dry hopping*).

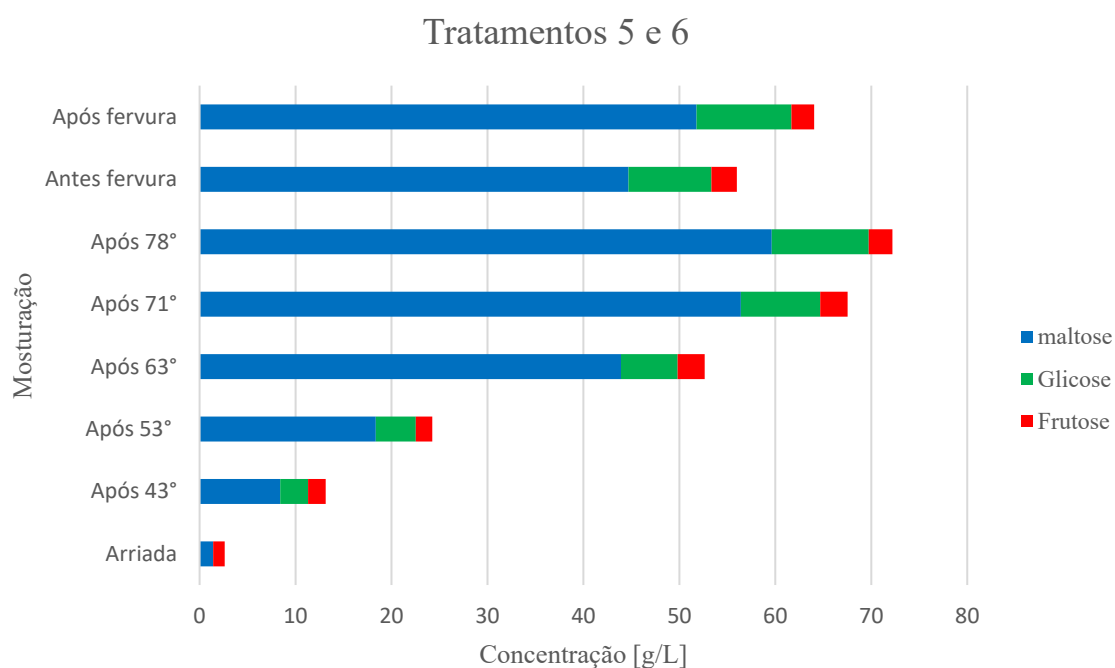


Figura 2.9 - Açúcares formados durante a mostura dos Tratamentos 5 e 6, com 100% malte pilsen de cevada.

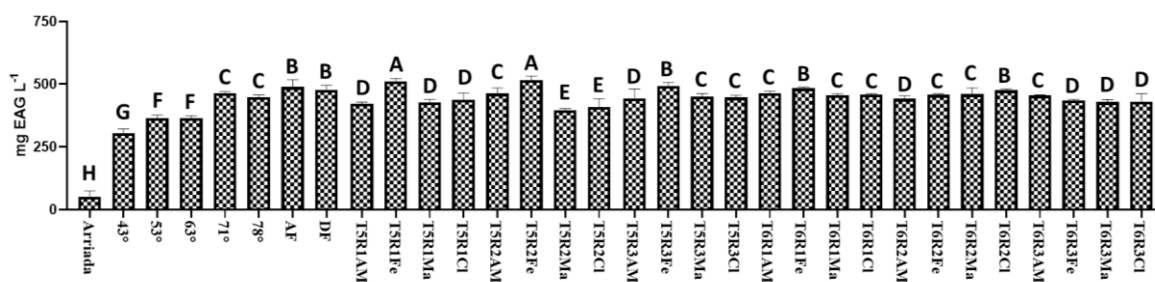


Figura 2.10 - Teor dos compostos fenólicos totais dos Tratamentos 5 e 6 pelo método do Folin Ci cateau.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A= momento em que se adiciona o malte à água, 43 °C = amostra após a rampa de 43 °C, 53 °C = amostra após a rampa de 53 °C, 63 °C = amostra após a rampa de 63 °C, 71 °C = amostra após a rampa de 71 °C, 78 °C = amostra após a rampa de 78 °C, AF = amostra antes da fervura após sparge, DF = amostra depois da fervura, T5 = Tratamento 5, T6 = Tratamento 6, R1 R2 e R3 = repetições dos testes, AM = amostra após 3 dias de fermentação antes de adicionar morango, AD = amostra após 7 dias de fermentação antes do dry hopping, Fe = amostras após o final da fermentação, Ma = amostras após o final da maturação, Cl = amostras após clarificação.

Observou-se resultado positivo no teor de fenólicos já no momento da arriada. Mesmo que os compostos fenólicos sejam encontrados predominantemente nas camadas externas dos grãos, uma alta proporção dos ácidos fenólicos é insolúvelmente ligada aos carboidratos da parede celular (HOLTEKJØLEN; KINITZ; KNUTSEN, 2006), o que explicaria a presença, mas em nível baixo do teor de compostos fenólicos nesta etapa. Além disso, a rampa de 43 °C é justamente para ativar a esterase do ácido ferúlico, ácido fenólico muito abundante nos maltes de cevada e trigo, pois essa enzima é ativada a partir de 40 °C, liberando os ácidos fenólicos ligados, o que justifica o aumento significativo do teor de fenólicos entre a arriada e a rampa de 43 °C. Este incremento continuou até a fervura. A subida gradativa está dentro do esperado visto que ocorre a solubilização dos compostos fenólicos do malte por reações enzimáticas e não enzimáticas durante as rampas da mosturação até o final da fervura. Zhao (2015) relatou que, geralmente, o processo de mosturação resulta em significativos incrementos no teor de fenólicos e uma vez que ela ocorrer em condições adequadas para a ação enzimática é provável que ocorra a liberação de compostos fenólicos ligados.

A tendência de queda dos compostos fenólicos após a fervura pode ser explicada pela adsorção dos mesmos ao trub. A formação do trub durante a ebulição do mosto é principalmente influenciada pela liberação de ligações dissulfídicas intramoleculares, por redução a grupos tiol e formação de novas ligações dissulfídicas intermoleculares. Isso leva a partículas mais grossas e pesadas se precipitarem. Compostos fenólicos oligoméricos mais elevados são mais ativos na formação de complexos com proteínas, no entanto, os ácidos fenólicos também interagem com as proteínas e são adsorvidas pelo trub quente (SIEBERT; TROUKHANOVA; LYNN, 1996). Além das interações proteína-polifenol, a formação de produtos de degradação e precipitação de compostos poliméricos, incluindo agregações polifenol-polissacarídeo, influenciam o destino dos fenólicos durante a ebulição do mosto (FUMI et al., 2011).

Observou-se uma queda dos fenólicos após 3 dias de fermentação em todas as repetições do Tratamento 5 (T5 R1 AM, T5 R2 AM e T5 R3 AM), e após os 7 dias de fermentação do Tratamento 6, antes do *dry hopping* (T6 R1 AM, T6 R2 AM e T6 R3 AM). Isso pode ser devido à precipitação de taninos e fenólicos e à absorção dos mesmos pela levedura durante a fermentação (ZHAO, 2015). Em um estudo Martinez-Gomez et al. (2020) também perceberam que os valores de compostos fenólicos totais diminuíram após a fermentação tanto em cervejas convencionais quanto em cervejas adicionadas de caqui. Ele associou essa queda a um maior nível de oxidação dos fenóis no início dessa fase.

Analisando o Tratamento 5 (onde se adicionou o morango), ao final da segunda fermentação (quando se adiciona o morango ocorre uma segunda fermentação devido aos açúcares presentes na fruta), houve um aumento significativo no teor de fenólicos nos fermentadores (T5 R1 Fe, T5 R2 Fe e T5 R3 Fe). Isso era esperado visto que o morango apresenta altos níveis desses compostos. Após a maturação e clarificação (T5 R1 Ma, T5 R2 Ma e T5 R3 Ma e T5 R1 Cl, T5 R2 Cl e T5 R3 Cl) todos apresentaram uma leve queda no total de fenólicos, mas ainda assim, quando comparado ao Tratamento 2 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70) os valores de fenólicos nos produtos finais do tratamento 5 com adição da fruta ficaram mais elevados. Em um estudo onde se adicionou pêssego à cervejas (JUNG et al., 2017) também encontraram um conteúdo fenólico total maior nas cervejas onde se adicionou a fruta em relação à amostra controle, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Salazar.Orbea et al. (2023) citam em seu trabalho que os principais compostos fenólicos dos morangos incluem proantocianidinas, antocianinas e

elagitaninos. A fruta apresenta matérias aromáticas que atuam nos nervos do olfato e do gosto aumentando o apetite. É uma fruta que tem efeito estimulante do apetite, facilita a digestão e é um excelente alimento para o fígado devido seu elevado teor de açúcares naturais. É fonte de Vitamina A, Vitamina C e folatos, rico em pectina e outras fibras solúveis que ajudam a baixar o colesterol.

Analisando o Tratamento 6 (onde se adicionou o lúpulo por *dry hopping*), ao final dessa etapa (T6 R1 Fe, T6 R2 Fe e T6 R3 Fe) houve um incremento do teor de fenólicos em relação à amostragem feita antes do *dry hopping* (T6 R1 AD, T6 R2 AD e T6 R3 AD). Como já comentado anteriormente isso era esperado devido á composição fenólica que o lúpulo apresenta. Após a maturação e clarificação (T6 R1 Ma, T6 R2 Ma e T6 R3 Ma e T6 R1 Cl, T6 R2 Cl e T6 R3 Cl) também houve uma queda desse teor de compostos fenólicos, mas ainda assim, quando comparado ao Tratamento 2 (100% malte pilsen de cevada e levedura W34/70) os teores de compostos fenólicos totais no Tratamento 6 ficou mais elevado nas 3 repetições do produto final.

Comparando o Tratamento 5 (100% malte pilsen de cevada, levedura W34/70 e adição de morangos) ao Tratamento 6 (100% malte pilsen de cevada, levedura W34/70 e adição de lúpulo por *dry hopping*) não foram encontradas diferenças significativas no teor de fenólicos totais.

### 2.3.3 Teor de Antioxidantes por DPPH e ABTS

As Figuras 2.11 e 2.12 mostram os resultados da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS dos Tratamentos 5 e 6.

A Figura 2.11 mostra a capacidade das amostras dos Tratamentos 5 e 6 em sequestrar radicais livres medida através da redução do radical livre DPPH, aqui expressa em % de atividade antioxidante. Houve um aumento na atividade antioxidante durante a mosturação até atingir 71 °C, mantendo-se constante até o final de fervura (78, AF, DF). Após o fim da fermentação com a adição da fruta (Tratamento 5) (T5 R1 Fe, T5 R2 Fe e T5 R3 Fe) houve um aumento considerável da atividade antioxidante em todas as amostras do tratamento 5. Também houve um aumento da atividade antioxidante no final da fermentação das amostras onde fez-se o *dry hopping* (Tratamento 6) (T6 R1 Fe, T6 R2 Fe e T6 R3 Fe), porém bem menos significativo que no Tratamento 5 ao final da fermentação. Porém, após a maturação e clarificação houve queda na atividade antioxidante nos dois tratamentos 5 e 6, sendo que,

ao final da clarificação o Tratamento 6 (T6 R1 Cl, T6 R2 Cl e T6 R3 Cl) apresentou resultados mais altos de atividade antioxidante do que o Tratamento 5.

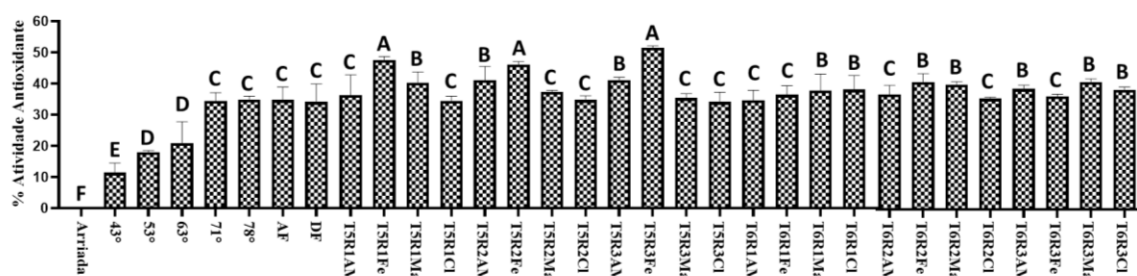


Figura 2.11 - Atividade Antioxidante dos Tratamentos 5 e 6 pelo método do DPPH.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A= momento em que se adiciona o malte à água, 43 °C = amostra após a rampa de 43 °C, 53 °C = amostra após a rampa de 53 °C, 63 °C = amostra após a rampa de 63 °C, 71 °C = amostra após a rampa de 71 °C, 78 °C = amostra após a rampa de 78 °C, AF = amostra antes da fervura após *sparge*, DF = amostra depois da fervura, T5 = Tratamento 5, T6 = Tratamento 6, R1 R2 e R3 = repetições dos testes, AM = amostra após 3 dias de fermentação antes de adicionar morango, AD = amostra após 7 dias de fermentação antes do *dry hopping*, Fe = amostras após o final da fermentação, Ma = amostras após o final da maturação, Cl = amostras após clarificação.

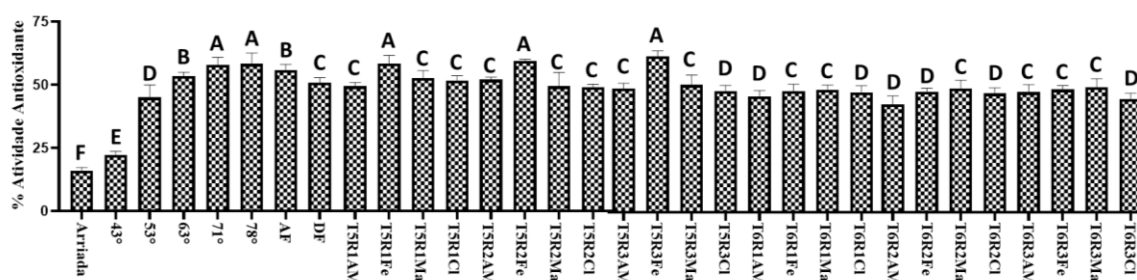


Figura 2.12 - Atividade Antioxidante dos Tratamentos 5 e 6 pelo método do ABTS.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A= momento em que se adiciona o malte à água, 43 °C = amostra após a rampa de 43 °C, 53 °C = amostra após a rampa de 53 °C, 63 °C = amostra após a rampa de 63 °C, 71 °C = amostra após a rampa de 71 °C, 78 °C = amostra após a rampa de 78 °C, AF = amostra antes da fervura após *sparge*, DF = amostra depois da fervura, T5 = Tratamento 5, T6 = Tratamento 6, R1 R2 e R3 = repetições dos testes, AM = amostra após 3 dias de fermentação antes de adicionar morango, AD = amostra após 7 dias de fermentação antes do *dry hopping*, Fe = amostras após o final da fermentação, Ma = amostras após o final da maturação, Cl = amostras após clarificação.

Analisando a Figura 2.12 observou-se que também houve um aumento na Atividade antioxidante pelo método ABTS durante a mosturação até a temperatura de 71 °C. Houve uma queda dessa atividade até o final da fervura visto que houve a lavagem do bagaço e formação do trub durante o *whirpool*, pois nessa fase ocorre a precipitação de proteínas e polifenóis absorvidos gerando o trub. Houve um incremento da atividade antioxidante após a fermentação das amostras do Tratamento 5 (com adição de morango) (T5 R1 Fe, T5 R2 Fe e T5 R3 Fe) e do Tratamento 6 (com *dry hopping*) (T6 R1 Fe, T6 R2 Fe e T6 R3 Fe), porém muito mais significativo no Tratamento 5. Ao final da clarificação o Tratamento 5 apresentou resultados mais altos de atividade antioxidante do que o Tratamento 6. O Tratamento 6 apresentou valores de ABTS em 47,34%, 47 % e 44,81% após a clarificação e o Tratamento 5 apresentou 51,73%, 49,11% e 47,85%.

As duas metodologias mostraram resultados de atividade antioxidante significativamente mais altos após a adição dos morangos nas cervejas, porém essa diferença não foi tão representativa entre os tratamentos nos produtos após a clarificação. O que pode ter acontecido é da fruta ter agregado à cerveja compostos fenólicos de cadeias grandes, e posteriormente eles se agregaram às proteínas e levedura depositando-se no fundo dos fermentadores durante a maturação e clarificação. Em um estudo sobre o efeito do processamento dos morangos e maçãs em termos de compostos fenólicos Salazar-Orbea et al. (2023) cita que são duas frutas muito utilizadas a nível industrial devido ao seu excelente sabor e aceitação por uma ampla gama de consumidores e ao seu alto teor de compostos bioativos. Segundo eles, os principais compostos fenólicos dos morangos incluem proantocianidinas, antocianinas e elagitaninos, enquanto na maçã os principais compostos são proantocianidinas, ácidos hidroxicinâmicos, dihidrocalconas e flavonóis.

O método DPPH apresentou resultados de atividade antioxidante ligeiramente mais baixos que o método ABTS, mas ambos apresentaram comportamento de aumento e queda desde a mosturação até o produto final muito parecidas, sendo complementares entre si. Shopska et al. (SHOPSKA et al., 2021) também observaram essa diferença entre os métodos em um estudo de avaliação de atividade antioxidante e compostos fenólicos de maltes e mostos. Isso era esperado visto que os dois métodos são baseados na interação dos reagentes com os prótons liberados pelos compostos fenólicos, e a pequena diferença entre eles deve se dar devido a uma diferença na força de reação dos agentes oxidantes (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Zhao et al. (2010) citam que antioxidantes com capacidade de eliminação de radicais livres DPPH podem doar hidrogênio a eles, particularmente aos peróxidos lipídicos ou radicais hidroperóxidos que são os principais propagadores da cadeia de autoxidação de lipídeos e formar espécies não radicais, resultando na inibição da fase de propagação da peroxidação lipídica. Logo, cervejas com maior eliminação de radicais DPPH são importantes para a estabilidade do sabor da cerveja, pois seu envelhecimento geralmente é associado à formação de trans-2-nonenal e outros aldeídos saturados devido à oxidação lipídica. Eles também encontraram resultados de atividade antioxidante pelo método do DPPH mais baixos que ABTS nas cervejas analisadas. Segundo Zhao et al. (2015) diferentes cinéticas de reação entre o fenol e o cátion do radical ABTS e o radical DPPH sobre uma gama de concentrações de compostos fenólicos pode levar a resultados diferentes entre os dois métodos. A atividade do radical ABTS em eliminar cátions também reflete a capacidade de doação de hidrogênio, logo, cervejas com atividade antioxidante mais altas por ABTS podem estabilizar os radicais ativos de oxigênio e ter uma melhor estabilidade de sabor. Logo, os dois métodos são complementares entre si (SHOPSKA et al., 2021).

Piazzon et al. (2010) relataram que o conteúdo de fenólicos totais está diretamente relacionado à atividade antioxidante da cerveja envolvida. Se compararmos o teor de compostos fenólicos dos Tratamentos 5 e 6 houve também uma correlação com as atividades antioxidantes durante o processo produtivo das cervejas, ou seja, um aumento durante a mosturação, uma subida após a adição dos morangos e o *dry hopping* e uma queda nas amostras após a clarificação, indicando que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante das cervejas.

Analisando o Tratamento 2 e o Tratamento 5, ambos preparados com 100% malte pilsen e levedura w34/70, o segundo com adição de morango durante a fermentação, observou-se um incremento dos compostos fenólicos devido à adição da fruta. O teor de compostos fenólicos totais do Tratamento 2 foi 392,63 mgEAG.L<sup>-1</sup>, enquanto as cervejas adicionadas de morango apresentaram 431,43 mg EAG.L<sup>-1</sup>, ou seja, tiveram um aumento no teor de compostos fenólicos. Nardini e Garuso (2020) fizeram um estudo com cervejas convencionais e adicionadas de frutas. A maioria das cervejas com frutas apresentou atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais superiores às cervejas convencionais. Também foi observada uma forte correlação entre a atividade antioxidante e



o conteúdo de compostos fenólicos, sugerindo que esses compostos possuem um papel fundamental na atividade antioxidante das cervejas (NARDINI; GARAGUSO, 2020).

Analisando o Tratamento 2 e o Tratamento 6, ambos preparados com 100% de malte pilsen e levedura W34/70, o segundo com adição de lúpulo pela técnica de *dry hopping* durante a fermentação, observou-se um incremento dos compostos fenólicos devido à adição do lúpulo à frio. As cervejas adicionadas de lúpulo apresentaram o teor de fenólicos totais de 454,65 mg EAG.L<sup>-1</sup>, representando também um ganho de compostos fenólicos. Hrabia et al. (2022) analisou a atividade antioxidante de cervejas com *dry hopping* feito a 20 °C, concluindo que o *dry hopping* pode ter um efeito positivo na estabilidade oxidativa da cerveja, medida por espectroscopia ESR. Um aumento significativo no parâmetro *lag time* (tempo após o qual se iniciam as reações de formação de radicais livres, que é um bom indicador do potencial antioxidante da cerveja) foi observado para todas as cervejas lupuladas a 20°C. Da mesma forma, realizando o processo a 20 °C causou uma diminuição na taxa de formação de radicais em cada amostra lupulada. Kunz et al. (2014) fizeram um estudo de adições tardias de lúpulo em cervejas. Eles mostraram que o *dry hopping* após a fermentação e os regimes de dosagem incremental de lúpulo diminuíram acentuadamente a geração de radicais livres em comparação ao controle, indicando um aumento na estabilidade oxidativa da cerveja.

## 2.4 CONCLUSÕES

Com base nas análises realizadas nos mostos e nas cervejas conclui-se que os resultados foram similares em relação a resultados encontrados em outros trabalhos. A evolução do pH durante a mosturação apresentou comportamento esperado para a fabricação de cervejas, onde inicialmente tem-se uma queda pelo efeito do tamponamento dos maltes até pH entre 5,6 e 5,8, com ligeira queda até o final da mosturação. A queda do mesmo até as primeiras 60 horas de fermentação também é um fator esperado, pois é consequência do metabolismo da levedura liberar H<sup>+</sup> ao meio durante o processo fermentativo. Após esse período o pH obteve-se inalterado até o final da produção.

A evolução dos açúcares durante a mosturação também foi um resultado esperado, visto que as rampas para ativação das enzimas foram feitas com intuito de obter mostos com maior quantidade de maltose, seguido de glicose e frutose, substratos que a levedura utiliza para o processo fermentativo em proporções que evitam seu estresse.

Observou-se em todos os tratamentos um incremento no teor de compostos fenólicos durante a mosturação até a inativação enzimática, a partir daí, devido à sedimentação desses compostos com o *trub* do mosto duranteo *whirlpool* e o *cold crash* (diminuição da temperatura para maturação e clarificação da cerveja) faz com que esses compostos diminuam no produto final.

Os Tratamentos 1 e 2 feitos com 100% malte pilsen de cevada utilizando os dois tipos de levedura não apresentaram diferença significativa entre si nos teores de fenólicos totais, assim como os Tratamentos 3 e 4 feitos com malte pilsen de cevada adicionados de 50% de malte de trigo com as duas leveduras também não apresentaram diferença significativa de teor de fenólicos totais entre si, mostrando que as leveduras não contribuem de maneira com relação a esses compostos na cerveja. Já os Tratamentos 1 e 2 produzidos com 100% de malte pilsen de cevada mostraram valores significativamente mais altos de teor de fenólicos totais em relação aos Tratamentos 3 e 4 produzidos com malte pilsen de cevada adicionada de 50% de malte de trigo, mostrando que o malte pilsen contribui mais com a composição fenólica da cerveja que o malte de trigo. Já o teor de compostos fenólicos totais encontrado nos Tratamentos 5 e 6, onde adicionou-se morangos e lúpulo por *dry hopping*, apresentou-se superior do que nas amostras onde não se adicionou, mostrando-se uma boa alternativa para enriquecimento de compostos bioativos na cerveja.

A atividade antioxidante por ABTS mostrou valores mais elevados que o método DPPH. Isso foi relatado em outros trabalhos durante a malteação da cevada (SHOPSKA et al., 2021), e na avaliação de atividade antioxidante de cervejas (YANG; GAO, 2021), corroborando com nossos resultados.

A composição fenólica da fruta e do lúpulo resultou em um aumento na atividade antioxidante das cervejas produzidas, mostrando que os dois representam boas alternativas para aumentar o teor de compostos bioativos na cerveja, atuando tanto como aditivos quanto como conservantes naturais.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, R. **The chemistry of beer: The Science in the Suds**. Editora Wiley, 2013, cap. 8, p. 149-158. <https://doi.org/10.1002/9781118733745>

DE ALMEIDA, F. et al. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. **Food Chemistry**, v. 263, p. 112-118, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.109>

ESTEVEZ, E.; HELENA, C.; MARIA, R. Aspectos nutricionais e funcionais do morango. **Visão Acadêmica**, v. 8, n. 1, Jan/Jun 2007. <https://doi.org/10.5380/acd.v8i1.11660>

FOX, G. P. et al. Effect of varying starch properties and mashing conditions on wort sugar profiles. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 4, p. 412-421, 2019. <https://doi.org/10.1002/jib.585>

FUMI, M. D. et al. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 568-573, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.006>

GASINSKI, A. et al. Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25133033>

GEBREMARIAM, M.; ZARNKOW, M.; BECKER, T. Thermal stability of starch degrading enzymes of teff (*Eragrostis tef*) malt during isothermal mashing. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 1928-1932, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.019>

HAUSER, D. G.; ZARNKOW, M.; BECKER, T. Extraction Efficiency of Dry-Hopping. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 3, p. 188-198, 2019. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1617622>

HOLTEKJØLEN, A. K. KINITZ, C.; KNUTSEN, S. H. Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2253-2260, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf052394p>

HRABIA, O. et al. Effect of dry hopping on the oxidative stability of beer. **Food Chemistry**, v. 394, n. 5, p. 1939-1953, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133480>

JUNG, K. et al. Influence of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Fruit Addition on Quality Characteristics and Antioxidant Activities of Beer. **International Journal of Sciences**, v. 3, n. 8, p. 186-191, 2017. <https://doi.org/10.18483/ijSci.1411>

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>

KAWA-RYGIELSKA, J. et al. Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. **Food Chemistry**, v. 281, p. 147-153, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.093>

KIM, J. H. et al. Alginate/bacterial cellulose nanocomposite beads prepared using *Gluconacetobacter xylinus* and their application in lipase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 137-145, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.074>

KUNZ, T. et al. Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 415-425, 2014. <https://doi.org/10.1002/jib.162>

KUNZE, W. **Technology brewing and malting 2004**. Germany, VLB Berlim, 3<sup>rd</sup> edition, 2004.

LI, H.; LIU, F. Changes in organic acids during beer fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 3, p. 275-279, 2015. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0509-01>

MARTINEZ-GOMEZ, A.; CABALLERO, I.; BLANCO, C. A. Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. **Biomolecules**, v. 10, p. 1-18, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>

MARTINEZ, A. et al. Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 3, p. 319-327, 2017. <https://doi.org/10.1002/jib.434>

NARDINI, M.; GARAGUSO, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, v. 305, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10677-10683, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>

PORTES, M. T. **Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia Herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

POZEN, M. A. Enzymes in Brewing. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 156-164, 2015.

PRATT, P. L.; BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 218-228, 2003. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00162.x>

SALAZAR-ORBEA, G. L. et al. Stability of phenolic compounds in apple and strawberry: Effect of different processing techniques in industrial set up. **Food Chemistry**, v. 401, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134099>

SARANRAJ, P.; SIVASAKTHIVELAN, P.; NAVEEN, M. Fermentation of fruit wine and its quality analysis: A review. **Australian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 1-13, 2017.

SHOPSKA, V. et. al. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity of different malt types. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, 2021.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10071124>

SIEBERT, K.; TROUKHANOVA, N.; LYNN, P. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, P. 80-85, 1996.  
<https://doi.org/10.1021/jf9502459>

SZWAJGIER, D. Content of Individual Phenolic Acids in Worts and Beers and their Possible Contribution to the Antiradical Activity of Beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 243, 252, 2009. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00376.x>

UCHIDA, M.; et al. Carbohydrates in Brewing. I. Determination of Fermentable Sugars and Oligosaccharides in Wort and Beer by Partition High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 49, p. 1-10, 1991.  
<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0065>

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, V. 17, N. 4, P. 953-988, 2018.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>

WE CONSULTORIA. Disponível em <https://weconsultoria.com.br/materiais-digitais/materiais-digitais/>

YANG, D.; GAO, X. Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, p. 754, 764, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.048>

ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of mashing on total phenolic contents and antioxidant activities of malts and worts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 240-247, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02831.x>

ZHAO, H. et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>