

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ SCATOLIN CORRÊA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DO TEOR DE COMPOSTOS
FENÓLICOS TOTAIS DE TRÊS VARIEDADES DE LÚPULO (*HUMULUS*
LUPULUS)**

PATOS DE MINAS – MG
OUTUBRO 2021

BEATRIZ SCATOLIN CORRÊA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DO TEOR DE COMPOSTOS
FENÓLICOS TOTAIS DE TRÊS VARIEDADES DE LÚPULO (*HUMULUS*
LUPULUS)**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia como requisito final
para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes

PATOS DE MINAS – MG

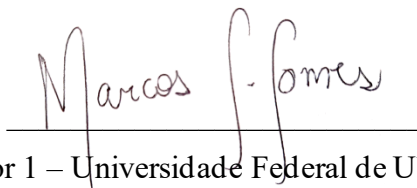
OUTUBRO 2021

BEATRIZ SCATOLIN CORRÊA

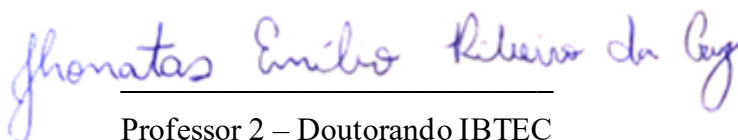
Avaliação do potencial antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais de três variedades de lúpulo (*humulus lupulus*)

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

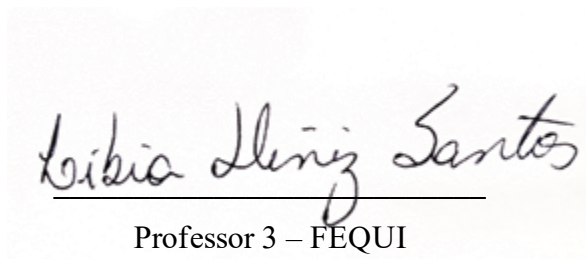
Banca examinadora:



Professor 1 – Universidade Federal de Uberlândia
Presidente



Professor 2 – Doutorando IBTEC
Membro



Professor 3 – FEQUI
Membro

Patos de Minas – MG, outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gratidão a Deus, por toda força, para que eu conseguisse enfrentar todos os obstáculos até aqui, luz e guia, para que me direcionasse ao melhor caminho e aos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu pai, Marcos César de Souza Corrêa e a minha mãe, Silvia Elena Scatolin por todo apoio, compreensão, motivação e suporte de todas as formas concedidas para que eu pudesse realizar mais esse sonho de finalizar essa etapa tão importante, além de sempre acreditarem e confiarem em mim.

Ao meu irmão, Leonardo Scatolin Corrêa e todos os meus familiares, por todo carinho, paciência, amor e atenção.

Ao meu prezado orientador Dr. Marcos de Souza Gomes, por ter me acolhido nesse projeto de formação, ter dado todo suporte, ensinamento e auxílio necessário para que essa monografia saísse com excelência, além de toda paciência, sempre muito solícito e presente.

Ao mestrando João Vítor Nunes por toda paciência, colaboração em laboratório e com seus conhecimentos, que fora fundamental para execução desse trabalho e aos técnicos de laboratório que foram muito solícitos e prestativos em toda ajuda necessária.

Ao meu namorado Leonardo, por todo amor, apoio, motivação e compreensão, além de sempre confiar em mim.

Aos meus queridos amigos Fernanda, Júlia, Bruno e Vinicius por me apoiarem tanto efetivamente, me guiarem, por todo companheirismo, carinho e por não medirem esforços para me ajudar.

A todos os outros amigos que não foram citados, tanto os colegas de curso e as amizades criadas em Patos de Minas durante essa graduação, como as tidas nas demais cidades em que passei ou vivi, que sempre me deram muita segurança, alegrias e apoio.

A Prof^a. Dr^a. Líbia Diniz Santos e ao Me. Jonathan Emílio Ribeiro por terem aceitado o convite para compor minha banca.

Aos programas de extensão e entidades, e seus respectivos membros, na qual participei e colaboraram na minha formação humanística, minha desenvoltura e me ensinaram a enfrentar todos os desafios que passei.

Agradeço a todos meus professores que tive contato durante a graduação, na qual passaram diversos ensinamentos ao decorrer do curso, que contribuíram para toda minha experiência e aprendizado.

Agradeço também a UFU por todos os recursos concedidos para que eu pudesse chegar até aqui, além de todos seus membros participantes que acreditam na ciência feita em nosso país.

A tudo e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para que essa fase tão importante acontecesse de maneira admirável e por todos os momentos vividos até o momento presente.

RESUMO

Com a constante incidência de resultados significativos de cunho vegetal em diversos âmbitos, tem-se acentuado estudos e pesquisas científicas em busca de diferentes análises fitoquímicas com propósitos na área da saúde e de cunho alimentício. Como exemplo disso, faz-se estudos de uma planta herbácea perene cujo nome popular é lúpulo, *Humulus lupulus*, que além da ampla utilização terapêutica e medicinal é recorrente seu uso intensificado na indústria cervejeira, evidenciando cerca de 97% da produção a esse setor. À vista disso, diante da importância do lúpulo para a indústria cervejeira e para o domínio da fitoquímica e área medicinal, o objetivo desse trabalho foi a avaliação da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais nas diferentes variedades de lúpulo de aroma (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum*). Desse modo, nesse trabalho foram realizadas cinco diferentes metodologias: DPPH, ABTS, fosfomolibdênio, poder redutor e teor de compostos fenólicos totais em extratos aquosos em diferentes concentrações e tempo. As três variedades testadas apresentaram alguma atividade antioxidante, sendo que de acordo com as diferentes concentrações os resultados mostraram-se em sua maioria dose dependentes. Baseando nessas análises, concluiu-se que a variedade *Hersbrucker* no tempo 5 minutos possuiu maior atividade antioxidante, com 78,21% no DPPH, 90,96% no ABTS, 0,478 de absorbância no fosfomolibdênio, 0,197 no poder redutor e 93,42 mgEAG g⁻¹ no teor de compostos fenólicos. Com isso, sugere seu possível uso na indústria farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chave: Análises fitoquímicas. Atividade antioxidante. *Humulus lupulus*. Cerveja. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

With the constant incidence of significant results of plant nature in different areas, studies and scientific researches have been accentuated in search of different phytochemical analysis with purposes in the health and food areas. As an example of this, studies are carried out on a perennial herbaceous plant whose popular name is hop, *Humulus lupulus*, which in addition to its wide therapeutic and medicinal use is recurrent its intensified use in the brewing industry, showing about 97% of its production. sector. In view of this, given the importance of hops for the brewing industry and for the domain of phytochemistry and medicine, the objective of this work was to evaluate the antioxidant capacity and the content of total phenolic compounds in different varieties of aroma hops (*Hersbrucker*, *Tradition* and *Ahtrhum*). Thus, in this work, five different methodologies were performed: DPPH, ABTS, phosphomolybdenum, reducing power and total phenolic compounds content in aqueous extracts at different concentrations and time. The three varieties tested showed some antioxidant activity, and according to the different concentrations the results were mostly dose dependent. Based on these analyses, it was concluded that the variety *Hersbrucker* at time 5 minutes had greater antioxidant activity, with 78,21% DPPH, 90,96% ABTS, 0,478 absorbance in phosphomolybdenum, 0,197 in reducing power and 93,42 mgEAG g⁻¹ in the content of phenolic compounds. With that, suggests its possible use in the pharmaceutical and food industry.

Keywords: Phytochemical analysis. Antioxidant activity. *Humulus lupulus*. Beer. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	- REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
	História da cerveja, sua conceituação e processos.....	11
	<i>Humulus lupulus</i>	14
	Compostos fenólicos.....	17
	Antioxidante	19
	OBJETIVOS.....	20
	Objetivo geral	20
	Objetivos específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Aquisição das amostras para a realização das análises	21
3.2	Preparação dos extratos.....	21
3.3	Análise da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais.....	22
3.3.1	Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH	22
3.3.2	Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS+•.....	22
3.3.3	Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio.....	23
3.3.4	Avaliação da atividade antioxidante por meio da metodologia do Poder Redutor	23
3.3.5	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	24
3.4	Análise estatística.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	Atividade Antioxidante medida por método DPPH.....	25
4.2	Atividade antioxidante medida pelo método ABTS	27

4.3	Atividade antioxidante medida por redução do complexo fosfomolibdênio	30
4.4	Atividade antioxidante medida pela metodologia do poder redutor	32
4.5	Compostos fenólicos totais	35
5	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

É observado desde os primórdios da civilização humana, na terapêutica popular e oficial, o uso constante das espécies vegetais, no qual propiciou ao homem o despertar para um longo percurso de manuseio dos recursos naturais em seu próprio benefício (SANTOS, 2018). Nessa perspectiva, a busca por novos compostos bioativos evidencia a relevância em se aprimorar com estudos no viés vegetal, destacando morfologias e análises fitoquímicas do mesmo.

Orientado à esses conceitos, o *Humulus lupulus* Linnaeus é o nome científico da espécie pertencente a ordem das *Rosales*, da família *Cannabaceae* (DURELLO *et al.*, 2019). Caracteriza-se por ser uma planta normalmente diplóide ($2n=20$), dióica, com óvulos anátropos, pertencente ao grupo vegetal com propriedades de planta herbácea perene. Possui características inerentes, como rápido crescimento, e a capacidade para crescer e rodar em simultâneo, trepando e enrolando os seus caules. O lúpulo, como é vulgarmente conhecido, pode atingir de 7 a 9 metros de altura em menos de 5 meses (SOUSA, 2005).

Embora o *Humulus lupulus* seja relatado com ampla utilização medicinal como tratamento de insônia, alívio de dores, má digestão, antidiuréticos, antiespasmódicos e até recomendado como sedativo, atualmente a utilização e estudo do lúpulo está direcionado na maioria dos trabalhos para a produção de cervejas. Para tal, utiliza-se das inflorescências femininas, com a finalidade de formar estróbilos das plantas o que permite desenvolver glândulas secretoras de lupulina, com capacidade de sintetizar e armazenar resinas e óleos essenciais ricos em principalmente terpenos e polifenóis (ALMEIDA, 2017).

O consumo de lúpulo pela indústria cervejeira abrange em torno de 97% de sua produção. Este confere principalmente aroma, amargor, estabilidade coloidal a espuma, além de atuar como antioxidante e antimicrobiano, protegendo a cerveja de processos oxidativos e de contaminações microbiológicas (DURELLO *et al.*, 2019).

Sabe-se que o estresse oxidativo é um desequilíbrio entre defesas antioxidantes e produção de espécies reativas, o que possibilitam que elas danifiquem outras estruturas de biomoléculas (PIZZINO *et al.*, 2017). Desse modo, o lúpulo pode contribuir de maneira significativa, já que é uma fonte de potentes antioxidantes, como os compostos fenólicos e óleos essenciais.

Portanto, diante da importância do lúpulo para a indústria cervejeira e para o domínio da fitoquímica e área medicinal, o objetivo desse trabalho foi a avaliação da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais das diferentes variedades de lúpulo (*Humulus lupulus*) de aroma (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum*).

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

História da cerveja, sua conceituação e processos

Há suposições significativas em relação a origem da cerveja, juntamente com a inicialização do uso de bebidas fermentadas pelo homem, e fundamentado a isso, registros históricos demonstraram que a cerveja apresentou forte participação na construção da história e da cultura de várias civilizações (MAZUROSKI, 2015). Embora não saibam de fato, existem estudos que datam o preparo da cerveja em aproximadamente 6.000 anos a.C no Egito, sendo oriunda de regiões da Mesopotâmia (LIMA; MOTA, 2003).

Equivalente à essas implicações, acredita-se que a cerveja tenha sido descoberta de maneira acidental, provavelmente derivada da fermentação não induzida de algum cereal, e nesse viés, por conterem os mesmos ingredientes, existem fortes relações entre a história da cerveja e do pão, visto que em determinada época da evolução das civilizações eram esses os produtos que faziam parte da alimentação e cultura da sociedade (SILVA *et al.*, 2016). Perante o exposto, surgiu a cerveja primitiva, que fora melhorada ao longo do tempo pelos sumérios, até chegarem a um gênero considerado como “bebida dos deuses” proveniente da massa do pão embebida ou fermentada (VILASTGALLEN, 2021). Tal fundamento é comprovado por registros antecedentes a escrita, como os desenhos rupestres.

Figura 1: desenhos rupestres – “pão líquido”



Fonte: Uol, 2021

Outra teoria convincente é a relação da cerveja como fator de sustentação social e cultural, com valor nutritivo, como moeda de troca e valor compensatório pelos trabalhos prestados em grupos sociais, tal atributo era tido como forma de pagamento às construções das grandes pirâmides (KEMP, 2018). Por ser uma bebida fermentada, a cerveja não era usada apenas pelo seu valor nutritivo, era consumida também com objetivo de evitar enfermidades

infecciosas adquirida ao beber água não tratada (VIEIRA *et al.*, 2021). Sendo assim era utilizada por seu caráter medicinal, além de haver evidências também com relação a práticas voltadas às funções cosméticas (OLIVEIRA, 2011).

É notório, de acordo com a cronologia do desenvolvimento da cerveja, enquadrá-la como agente impulsionador da evolução cultural humana. Isto posto, tendo novamente em questão o contexto histórico, sabe-se que a humanidade, nos primeiros 90.000 anos de sua história foi nômade, constituída de pequenos grupos de caçadores-coletores que se deslocavam em busca de água e alimento (LEE, 2005).

Evidências sugerem que a revolução agrícola permitiu que o homem posteriormente se transformasse em cultivador, motivado fortemente pela necessidade de produção regular de cerveja, e desse modo era incentivado o cultivo da cevada e outros grãos, que estariam sujeitos a fermentação. Para armazenagem provavelmente acondicionavam os grãos em um recipiente e com adição de água, sendo essa intencional ou não, os grãos supostamente brotariam, absorvendo então a água e produzindo, no processo inicial da cerveja, açúcar residual. Posteriormente, no suposto segundo processo de absorção de água haveria uma conversão pela levedura, do açúcar em gás carbônico e álcool, colaborando assim para um crescimento em estado selvagem da cevada nessas circunstâncias (MAZUROSKI, 2015).

No Brasil, possivelmente a bebida chegou no século XVII, com a colonização holandesa, pela companhia das Índias Ocidentais. Com a saída dos holandeses em 1654 a cerveja se absteve do país por um século e meio, reaparecendo no final do século XVIII, com a chegada da família real portuguesa e com a conseguinte abertura dos portos para comerciantes ingleses, fazendo vir da Europa, entre outros produtos, a cerveja (SANTOS, 2003). Mesmo não havendo uma data precisa para o início da produção de cerveja no Brasil, o primeiro anúncio sobre a venda da cerveja brasileira foi publicado no *Journal do Commercio* em 1836 (SIQUEIRA *et al.*, 2009). Com o desenvolvimento, atualmente, o setor cervejeiro é um dos mais tradicionais setores industriais do Brasil, incumbido de uma ampla capilaridade e indutor de uma forte economia nacional que emprega mais de 2,7 milhões de pessoas ao longo da cadeia produtiva (CERVBRASIL, 2018).

Embora tenham se passado séculos, a bebida conhecida naqueles tempos se assemelha com as atuais, porém essa arte milenar conta atualmente com tecnologia, inovação de materiais e profissionais mais especializados, além dos ingredientes básicos, que são água, malte de cevada, fermento e lúpulo (TSCHOPE, 2001). Sua produção foi aprimorada para abranger a larga escala, e através da fabricação da cerveja com fermentação etanoica de carboidratos presentes nos grãos de cereais realizada pelas enzimas glicolíticas das leveduras,

acontece a produção de diversos produtos finais com aproveitamento comercial (MELO *et al.*, 2019).

Genericamente, define-se cerveja como sendo uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, obtida através da fermentação alcoólica do mosto de cereal malteado, comumente malte de cevada, lúpulo, leveduras e água de boa qualidade, possibilitando ainda a adição de outras matérias primas como milho, arroz e trigo, que são fontes de carboidratos (ALMEIDA E SILVA, 2005). Especificamente, 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 (BRASIL, 2019). Seu sabor é determinado muitas vezes por essas matérias-primas, tipo de processo e pela levedura utilizada, juntamente com os compostos produzidos durante a fermentação e a maturação, que impactam as características sensoriais da bebida (CARVALHO *et al.*, 2007).

A produção da cerveja envolve inúmeras etapas, divididas em: malteação, moagem, mosturação, filtração, fervura, sedimentação e resfriamento (tratamento do mosto), ademais tem-se fermentação e maturação, na qual a fermentação se destaca por ser a etapa onde ocorre a transformação do mosto em cerveja (HOELZ; AZEVEDO, 2019). Como processo finalizador tem-se a clarificação, carbonatação e pasteurização para o então envase ou engarrafamento (SCHUH; PRECI, 2014). Acrescido a isso, existe basicamente uma classificação em dois tipos de cerveja, a chamada *lager*, elaborada a partir de uma levedura de baixa fermentação, e a *ale*, por uma levedura de alta fermentação (PALMER, 2017). As cervejas do tipo *lager* são fermentadas entre a temperatura de 7°C a 15°C, com a duração da fermentação e maturação de 5 a 7 dias (ARAÚJO *et al.*, 2003) e devido a temperatura baixa seus sabores e aromas são mais leves. Enquanto as do tipo *ale*, são fermentadas a temperaturas entre 18°C a 22°C com duração da fermentação e maturação de 3 a 5 dias (OLIVEIRA, 2011).

Ao se tratar de leveduras cervejeiras, tem-se as espécies do gênero *Saccharomyces* como as principais leveduras de cerveja, as quais a maioria estão relacionadas a *Saccharomyces cerevisiae*. Suas cepas podem ser tradicionalmente divididas em dois grupos, uma delas é chamada de “*top strains*” usada para o tipo *ale*, nas quais baseando na sua propriedade de floculação, a levedura ao final da fermentação tende a subir a superfície do mosto fermentado, apresentando seu nome decorrente desse fator. O contrário acontece com a cepa chama de “*bottom strains*”, que se deposita no fundo do tanque de fermentação e são

responsáveis pela fabricação do tipo *lager*. O fato dessas leveduras serem responsáveis pela fermentação foi explicado por *Louis Pasteur* em 1873, que como consequência fez-se intensificar seu reconhecimento e incremento na ciência, sendo essa descoberta decisiva para o processo de fabricação de uma cerveja mais controlada (KARABÍN *et al.*, 2018).

Orientado a esses conceitos, com a finalidade de prolongar a vida útil de bebidas, obteve-se o aproveitamento do lúpulo (*Humulus lupulus*) na cerveja desde o momento em que monges franceses e alemães cultivaram essa planta visando propriedades medicinais relaxantes. A partir disso, a monja alemã *Hildegard Von Bingen* confirmou e relatou em um livro “*Physicative Subtilitatum*” que as características do lúpulo conservavam e aromatizavam as bebidas, fazendo com que esses compostos responsáveis por essas propriedades impedissem a deterioração da mesma. Fundamentado nisso, o uso de outros adjuntos tornou-se menos usual (FAGHERAZZI *et al.*, 2017).

Humulus lupulus

O nome científico *Humulus lupulus* Linnaeus faz alusão a planta popularmente conhecida como lúpulo, pertencente à ordem das *Rosales* e à família *Cannabaceae*, a qual possui apenas dois gêneros *Cannabis* e *Humulus* (SPÓSITO *et al.*, 2019). Esse último gênero é composto por três espécies. *H. lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis*, duas dessas são cultivadas em larga escala principalmente com finalidade comercial, de maneira mais abundante e tradicional, o *H. lupulus* (DURELLO *et al.*, 2019).

Baseando nisso, o lúpulo caracteriza-se por ser uma planta normalmente diplóide ($2n=20$), dióica, com óvulos anátropos, pertencente ao grupo vegetal e com propriedades de planta herbácea perene. Possui características inerentes, como rápido crescimento, e a capacidade para crescer e rodar em simultâneo, trepando e enrolando os seus caules, podendo atingir de 7 a 9 metros de altura em menos de 5 meses (SOUSA, 2005).

Atrelado a essas e outras características, o lúpulo tem uma difícil adaptação ao clima brasileiro, pois carece de temperaturas reduzidas e de um tempo de exposição à luz variado, mais especificadamente entre nove e quatorze horas diárias, o que não ocorre em território brasileiro, porém mesmo o Brasil se encontrando em fase incipiente ainda assim há comprovações de êxitos, onde os agricultores recorrem à técnicas de adaptação para aumentar o fotoperíodo, juntamente com produtos que estimulam a brotação uniforme (SANTOS, 2018). No entanto, a maior parte se concentra entre os paralelos de latitude 35° e 55° atribuídas a países como Alemanha e Estados Unidos, já que nestes locais encontra-se

condições ideais para o cultivo, com solos arenosos profundos, de fácil drenagem, ricos em húmus, com um pH variando entre 6.0 e 6.5, além da alta exposição de luz durante o crescimento da planta e clima mais frio (NEVE, 1991).

O lúpulo tem sido usado como planta medicinal a mais de 2000 anos, em vista disso os primeiros escritos sobre uso medicamentoso remontam ao século XI quando o médico árabe Mesué descreveu seus efeitos anti-inflamatórios, após *Paracelsus* o cita com eficácias contra a indigestão, em seguida o médico italiano *Matthiolus* menciona seus efeitos diuréticos e o botânico alemão *Hieronymus Bock* que documentou a aplicação do lúpulo na ginecologia. A partir do século XIX, a fitoterapia centralizou os efeitos do lúpulo contra a insônia e como sedativo, porém a primeira referência sobre a funcionalidade do lúpulo em bebidas foi consignada apenas em 1158 pela já citada alemã *Hildegard Von Birgen* que teve como finalidade prolongar a vida útil das bebidas. Seguindo essa temática, esses argumentos tomaram mais força quando em 1516 em Baviera na Alemanha, decretaram a “lei da pureza”, deliberando que apenas o lúpulo, o malte de cevada e a água fossem utilizados para a produção da cerveja. O lúpulo é adicionado com o intuito também de conferir amargor e aroma a bebida (SPÓSITO *et al.*, 2019). Conduzido para os dias atuais, o consumo do lúpulo é utilizado quase exclusivamente para a fabricação de cerveja, praticamente 97% da plantação mundial a utiliza com esse propósito (DURELLO *et al.*, 2019).

Relacionado ao contexto histórico, com o tempo constatou-se que para a comercialização o interessante seria a utilização apenas das inflorescências femininas não fertilizadas, com finalidade de formação dos estróbilos das plantas que permitem com que seja desenvolvido glândulas secretoras de lupulina, que se caracteriza por ser um “pó” amarelo, com aplicações essenciais na produção cervejeira. A lupulina possui capacidade de sintetizar e armazenar resinas, essas com potencial para conferir amargor, e óleos essenciais, responsáveis pelo aroma, sendo que ambos são ricos em terpenos e polifenóis, que possuem propriedades antioxidantes (NOVAES *et al.*, 2019). A planta masculina, na maioria das regiões do mundo, é removida do cultivo comercial do lúpulo para prevenir a polinização, já que a oxidação dos ácidos graxos das sementes pode levar a sabores estranhos na cerveja, apesar que, sob outra perspectiva, são essenciais para o cultivo de novas variedades por hibridizações (LIN *et al.*, 2019).

O plantio do lúpulo costuma ser realizado por meio de sementes, rizomas, mudas ou pelo método de micropropagação vegetal, sendo que o melhor intervalo de estação é da primavera ao verão (DODDS, 2017). Na colheita, as flores do lúpulo são submetidas a

secagem até alcançar uma umidade de 12%, tal procedimento é feito como tentativa para evitar uma carga bacteriana advinda da inclusão do lúpulo no processo (TRINDADE, 2016).

Como fora comprovado que desde os primórdios da civilização humana, na terapêutica popular e oficial, o uso constante das espécies vegetais em próprio benefício tem-se ampliado (SANTOS, 2018), a utilização do lúpulo exemplifica como efeitos biológicos advindos da planta, relacionados a compostos fenólicos, que são originados do metabolismo secundário, tem despertado tanto interesse em consumidores e produtores. Os polifenóis são substâncias antioxidantes encontrados na discutida cerveja, adquiridos principalmente da casca da cevada malteada e no lúpulo, dos quais podem-se destacar os ácidos fenólicos, flavonoides, flavonóis, antocianinas e seus derivados produtos de oxidação, como as chalconas, além de apresentar também compostos mais complexos como os taninos (FREITAS, 2006). No entanto, embora existam trabalhos descrevendo o uso do lúpulo na área da saúde, devido a suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, fitoestrogênicas e calmantes, seu uso mais comum é na indústria cervejeira, conferindo aroma, amargor e estabilidade coloidal à espuma, além de atuar como antioxidante e antimicrobiano protegendo a cerveja de contaminações e processos oxidativos (DURELLO *et al.*, 2019).

É essencial destacar que apesar da característica aromática ser proveniente dos óleos essenciais e o amargor oriundo das resinas amargas, há mais compostos químicos que se modificam a partir dos efeitos do oxigênio, calor e umidade que também conferem amargor, e esses são os ácidos classificados como α -ácidos e β -ácidos. Representando conteúdo acima de 25% ou mais do peso seco dos cones de lúpulo, esses dois grupos contêm três constituintes como humulona, lupulona e cohumulona; e colupulona, adhumulona e adlupulona, respectivamente, os quais diferem entre si quanto à natureza da cadeia lateral, que é derivada dos aminoácidos hidrofóbicos: leucina, valina e isoleucina. Os ácidos citados exibem baixa solubilidade em água e são fracos, portanto, a grande parte do amargor da cerveja, deve-se aos compostos iso- α -ácidos, derivados das misturas de seis componentes principais correspondentes a três pares de estereoisômeros de compostos procedentes de cada um dos três α -ácidos do lúpulo. Enquanto os α -ácidos são isomerizados durante o estágio de fervura do mosto, os β -ácidos não sofrem isomerização, formando as huluponas, que são produtos de degradação amargos, quando presentes no decurso do processo de fervura do mosto, sendo uma contribuição de amargor menos expressiva (ARAÚJO, 2016).

A criação da métrica IBU ou “*International Bitterness Units*” foi estabelecida para o cervejeiro conhecer quanto de lúpulo deve ser usado para atingir o grau certo de amargor

tendo em vista que 1 mg de iso- α -ácidos por litro de cerveja equivale a 1 IBU (BISHOP, 1964).

Geralmente o lúpulo é adicionado durante ou após o processo de ebulição do mosto. Caso tenha como objetivo uma cerveja com bastante aroma, as diversas variedades de lúpulo são adicionadas desde a metade do tempo da fervura, preservando maiores quantidades dos compostos voláteis até o produto final ou até após a cerveja já ter sido fermentada, processo chamado de técnica *dry hopping*. Quanto as resinas, como em alta temperatura conseguem sofrer isomerização e solubilizar em água, é possível controlar e modificar o amargor durante o processo de fervura, conferindo características relativas a essa propriedade (KISHIMOTO *et al.*, 2006).

É relevante compreender que os teores de α -ácidos e β -ácidos podem variar de plantas da mesma variedade com idades diferentes e entre locais de plantio distintos, concluindo então que são essas concentrações desiguais que conferem mais de 100 variedades de lúpulo distintas (FAGHERAZZI *et al.*, 2017), o que leva uma alta possibilidade de estudo e interação com a área agrônômica.

Figura 2: lúpulo em flor e em pellets



Fonte: Cerveja da casa, 2018

Compostos fenólicos

Como já é evidente, a cerveja é considerada uma “bebida funcional” por dispor de fontes promotoras para a saúde, entre eles estão os compostos fenólicos, possuindo utilidade importantes na medicina tradicional por ser relatadas com propriedades biológicas interessantes, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, quimiopreventiva,

antibacteriana, e principalmente antioxidante, e é até tratada como remédios para estômago e distúrbios de sono (DI SOTTO *et al.*, 2018). É congruente a ideia desse trabalho, é usado por conter propriedades cruciais no feitiço da cerveja.

Relacionado a isso, tem-se observado atualmente grande interesse na pesquisa e no estudo desses compostos fenólicos em alimentos que contenham tais substâncias em sua composição, devido ao fato de apresentarem mais que suas funções nutritivas, visto que permitem auxiliar e prevenir distúrbios fisiológicos, apresentando algumas outras atividades funcionais como ação antiarterioscleróticas, anticarcinogênicas, antitrombóticas e antiosteoporóticas (MACIEL *et al.*, 2013). Além disso, os compostos fenólicos, apesar de seu papel importante nas características sensoriais, são excelentes doadores de elétrons, concebendo sua atuação como conservantes antioxidantes em alimentos e eliminadores de radicais em sistemas fisiológicos (NETO *et al.*, 2017).

A capacidade antioxidante, é relacionada à competência em eliminar os radicais livres e doar átomos de hidrogênio ou elétrons e em arranjar elétrons desemparelhados nos anéis aromáticos (MORAIS, 2017). No entanto, essa habilidade advém também da sua estrutura, especialmente do número e posição dos grupos hidroxila, juntamente com a natureza das já citadas substituições nos anéis aromáticos. De acordo com a estrutura química, há uma divisão em classes de compostos fenólicos, resultando em 8.000 diferentes compostos, dentre eles ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos (ROCKENBACH, 2008).

Compostos fenólicos presentes na cerveja, também influenciam no seu processo de conservação, e consequentemente na vida de prateleira de muitos produtos da indústria alimentícia, já que a oxidação que ocorrem nos alimentos podem alterar características organolépticas dos mesmos, como exemplo tem-se a oxidação dos taninos que podem levar ao escurecimento da bebida (MACIEL *et al.*, 2013). Para que haja essa prevenção acontece a inclusão de compostos fenólicos na classe de neutralizadores de radicais livres, de maneira natural apresentando conjugação com derivados funcionais, tais como ésteres e metil ésteres, ou mono e polissacarídeos ligados a um ou mais grupos fenólicos (BALASUNDRAM, 2006).

Segundo viés químico, os compostos fenólicos constituem-se por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxil substituintes no anel, incluindo seus derivados funcionais, são originados do metabolismo secundário das plantas que diferem em estrutura química e reatividade (BERTOLDI, 2006), e constituem um grupo diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina, além de serem essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, encontrando-se na forma livre, ou de glicosídeos e proteínas (ROCKENBACH, 2008). Como fora exposto, esses metabólitos são secretados pelas glândulas de lupulina dos

cones femininos de lúpulo, e apesar de serem grupos de compostos que não são sintetizados por humanos, são valiosos para a vida dos mesmos (LIN *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos variam devido à qualidade e quantidade das matérias-primas utilizadas, bem como as técnicas empregadas de produção de cerveja (PIAZZON *et al.*, 2010), sendo que para se obter uma maior concentração na absorção desses compostos fenólicos é aconselhável que o produto seja consumido logo após sua fabricação, já que pesquisas indicam que após 15 dias de prateleira, pode haver a perda de até 35% dos polifenóis, aumentando para 50% de perda até o final do seu prazo de validade. Devido essa presença de compostos fenólicos, ao consumir a cerveja com moderação, mesmo que inconscientemente, uma pessoa absorve para sua dieta substâncias que previnem doenças que acometam a saúde da mesma, consequentemente levando a uma diminuição da taxa de mortalidade (MACIEL *et al.*, 2013).

Antioxidante

A identificação de compostos antioxidantes vem despertando cada vez mais o interesse de estudiosos, isso acontece já que tais substâncias são capazes de retardar ou inibir danos devidos à oxidação de biomoléculas que causam prejuízos em membranas e conteúdos celulares. Tais compostos, quando presentes em baixas concentrações em comparação à concentração de uma substância oxidável, podem manter o equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes, como exemplo tem-se os radicais livres e a concentração de compostos antioxidantes, minimizando assim malefícios no organismo (CHIDAMBARA-MURTHY *et al.*, 2002).

Em organismos vivos, o estresse oxidativo pode levar à formação de compostos potencialmente tóxicos e danosos, como os radicais livres, que prejudicam a saúde humana podendo contribuir para o envelhecimento, além de aumentar o risco de doenças cardíacas e degenerativas. Esse processo oxidativo está relacionado à possíveis ações de espécies reativas ao oxigênio em componentes celulares que são vitais aos seres (BERTOLDI, 2006).

Através de mecanismos como alteração da produção de radicais, eliminação de precursores de radicais, quelação de metais e elevação dos níveis de antioxidantes endógenos, esses compostos antioxidantes retardam a velocidade de oxidação, reagem com os radicais livres, restringindo então seus efeitos danosos ao organismo (PIMENTEL *et al.*, 2005). Tais substâncias podem ser classificadas em duas categorias principais, os antioxidantes primários e os secundários. São caracterizados por primários os que tem a ação antioxidante capaz de

inibir ou retardar a oxidação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando assim os radicais em substâncias estáveis. Já os secundários exibem uma variedade de modos de ação como a alteração de valência através da ligação de íons metálicos, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares, impedindo a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos como os radicais peroxila (SILVA *et al.*, 2010). Nessa classe encontram-se os antioxidantes sintéticos, como vitaminas A, C e E e também os compostos fenólicos (DONNELLY; ROBINSON, 1995).

Em paralelo ao que fora apresentado, os antioxidantes também têm sido exibidos com função conservadora em alimentos, inclusive foram definidos pela FDA (*US Food and Drug Administration*) como substâncias que mantêm a qualidade sensorial, nutricional e aumenta vida útil dos alimentos (BERTOLDI, 2006). Com isso há um crescente interesse na obtenção de compostos antioxidantes provenientes de produtos vegetais, até mesmo pelo fato de que consumidores vêm apresentando rejeições pelo uso de antioxidantes sintéticos (PAREJO *et al.*, 2002).

Se tratando da cerveja, o uso de elementos antioxidante naturais é evidenciado em sua maior quantidade nas matérias-primas utilizadas na sua elaboração. Essas substâncias foram relatadas por conter ácido fólico, vitaminas do complexo B e os tão citados polifenóis (FREITAS, 2006), principalmente advindos do lúpulo, com compostos caracterizados como xantohumol e isoxantohumol (DURELLO *et al.*, 2019).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais de três variedades de lúpulo (*Humulus lupulus*).

Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante das variedades de lúpulo, utilizando o teste de captura do radical DPPH[•].
- Avaliar a capacidade antioxidante das variedades de lúpulo, empregando o teste de captura do cátion radical ABTS⁺.

- Avaliar a capacidade antioxidante das variedades de lúpulo, usando o método de redução do complexo de Fosfomolibdênio.
- Avaliar a capacidade antioxidante das variedades de lúpulo, usando a metodologia do poder redutor.
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais presentes nas diferentes variedades de lúpulo, utilizando o teste de *Folin-Ciocalteu*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição das amostras para a realização das análises

As três amostras de lúpulo foram adquiridas em mais de um estabelecimento especializado na comercialização de produtos para a fabricação de cerveja, são elas as variedades de aroma *Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum*. Elas estavam na forma de pellets, simulando como se faz em uma linha de produção cervejeira, e a qualidade desse material foi prezada, aferida por meio das informações na embalagem do fornecedor. De posse dos lúpulos peletizados foi feito um acondicionamento deles no refrigerador em uma temperatura de 4°C a fim de manter a qualidade das amostras e evitar perdas significativas dos fitoquímicos de interesse.

3.2 Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos foi pesado em balança analítica um conteúdo de 20g do lúpulo seco peletizado o qual foi submetido a extração em 1 litro de água em ebulição durante os tempos de 0 minutos e 5 minutos.

O tempo de 0 minutos foi definido pelo momento em que a água entrou em ebulição e de imediato ao finalizar fervura desligou-se o fogo e colocou-se o lúpulo, após alguns segundos esse extrato fora usado para a análise. No tempo de 5 minutos, o lúpulo foi colocado pós ebulição da água deixando-os 5 minutos no processo da fervura. Tais procedimentos simulam uma decocção e uma infusão, situação essa semelhante a aquela vista na produção da cerveja. Em seguida, foram realizadas as diluições para cada análise química.

3.3 Análise da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais

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

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) será realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz et al. (2008) e Guimarães et al. (2011), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH será preparada na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH serão adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição dos extratos de lúpulo 1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em paralelo, o controle negativo será preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Para a comparação das atividades o padrão BHT foi avaliado nas concentrações 1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) será calculada usando a seguinte equação:

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

Em que:

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

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

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

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

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) será realizada de acordo com Antunes et al. (2010) e Guerreiro et al. (2013). Para o ensaio foram misturados 10 μL dos extratos de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 990 μL da solução do radical ABTS^{•+}. A absorbância será monitorizada espectrofotometricamente a 735 nm, durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS^{•+} atuarão como controle

negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS•+ (AA%) pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

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

Em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo

A_{Am} = Absorbância da amostra

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

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

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

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

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do poder redutor será realizada de acordo com a metodologia de Oyaizu (1986). 100 μL do extrato de lúpulo (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram misturadas com 1 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 1 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%. Após 20 minutos de incubação a 50°C, 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura, sendo essa agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada foi adicionada e 600 μL cloreto férrico 0,1%.

Leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

3.3.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

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

3.4 Análise estatística

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (7 x 5), sendo (6 extratos do lúpulo e o antioxidante padrão BHT) e 5 concentrações (62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 3 repetições. Já para o teor de fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 6 tipos de extratos (3 repetições). O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. As figuras foram feitas no software GraphPad Prism versão 5.01.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade Antioxidante medida por método DPPH

De acordo com Andrade et al. (2007), antioxidantes denominam-se como substâncias que ao inibirem a propagação da reação de oxidação em cadeia retardam ou previnem, de maneira significativa, a oxidação de lipídios e outras moléculas, fazendo com que reparem danos ocasionados às células através das espécies reativas de oxigênio (ANDRADE *et al.*, 2007). Diante disso, substâncias naturais produzidas pelas plantas, como os óleos essenciais responsáveis pelo aroma da cerveja, têm apresentado um grande potencial antioxidante, demonstrando assim resultados promissores (SIMÕES *et al.*, 2007).

O ensaio de DPPH geralmente é utilizado para avaliar a capacidade e que os compostos antioxidantes possuem de eliminação dos radicais livres, responsáveis muitas vezes por estresse oxidativo (PARTHASARATHY *et al.*, 2009). Tal metodologia tem como objetivo avaliar a capacidade das substâncias utilizadas em doar hidrogênio radicalar a esse radical e seu princípio se baseia na descoloração de uma solução composta por radicais DPPH de cor violeta para uma solução contida pelo composto DPPH de cor amarela (GOMES, 2014). Em outras palavras, tem-se que por ação de um antioxidante ou de uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido, ficando na coloração amarela, com o consequente desaparecimento da absorção, sendo monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH remanescente no meio (BORGES *et al.*, 2011).

Através do método de captura do radical livre DPPH, as três variedades de lúpulo, sendo elas *Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum*, colocadas tanto no tempo 0 após a água entrar em ebulição, como no tempo de 5 minutos concomitante à ebulição da água, obteve-se seus valores aproximados e estão dispostos no gráfico relativo à figura 3.

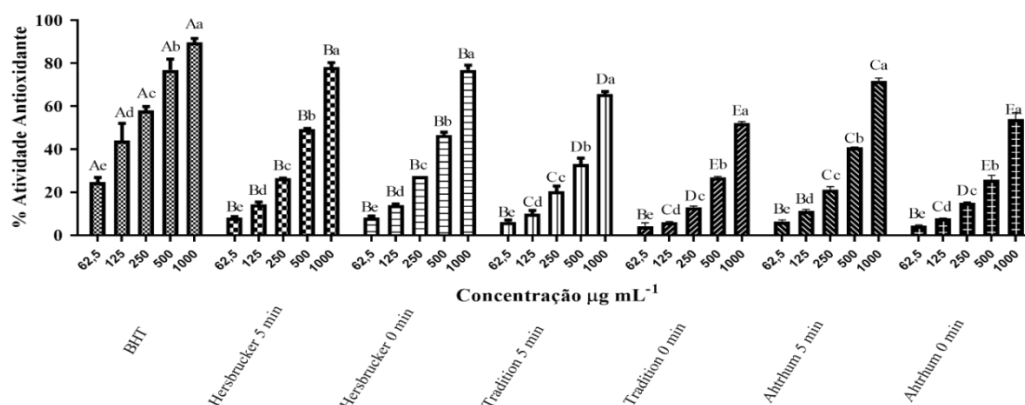


Figura 3 - Atividade antioxidante das três variedades de lúpulo (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum* nos tempos 0 e 5 minutos) e do padrão BHT pelo método DPPH. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Foi possível observar que comparando as três variedades, a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi mais elevada em todos os tipos de lúpulo, sendo a mais concentrada e consequentemente com maior porcentagem de atividade antioxidante. Verifica-se que a variedade *Hersbrucker* no tempo de 5 minutos, foi a que apresentou maior atividade antioxidante (78,21%), enquanto a menor foi a *Tradition* no tempo de 0 minutos (52,18%) seguido pelo *Ahtrhum* no tempo 0 também (54,13%). Em relação a esses resultados, assume-se que com o material vegetal estando 5 minutos em ebulição com a água houve uma maior porcentagem de atividade antioxidante comparado com as extraídas no tempo 0, logo após a água entrar em ebulição. Na menor concentração, de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, congruente aos mesmos resultados da maior concentração o *Hersbrucker* no tempo de 5 minutos foi o que apresentou maior atividade antioxidante (8,23%), comparado as demais variedades nessa concentração, e o menor foi o *Tradition* em 0 minutos (4,18%). Comparando as outras faixas de concentrações centrais, também se observa algo bem similar a isso.

Percebe-se então, que houve diferenças significativas na porcentagem de atividade antioxidante entre todas as variedades e entre as diferentes faixas de concentração em uma mesma variedade. No entanto, nenhum dos extratos aquosos, analisando todas as faixas de concentrações, exibiu uma atividade antioxidante superior ao padrão BHT.

Analisando as faixas de concentração do padrão e dentro de cada extrato, observou-se que um aumento da concentração ocasionou em um acréscimo da porcentagem de atividade antioxidante, tanto no BHT como nas três variedades de aroma em diferentes tempos. Desse

modo, os valores das atividades antioxidantes dos extratos e do padrão são menores na faixa de concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ aumentando consideravelmente até $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A vantagem do método DPPH, advém da sua reação com toda a amostra em um tempo suficiente que permite com que ele reaja lentamente até com os antioxidantes fracos. Esse método pode ser utilizado em sistema aquosos e solventes orgânicos não polares, sendo usado também para examinar tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos. Portanto, o ensaio DPPH é considerado válido, preciso, fácil e econômico, para avaliar assim a atividade de eliminação radical de antioxidantes, já que o composto radical é estável (KEDARE, 2011).

Segundo Krofta e colaboradores (2008) o método baseado na reação do radical DPPH estável mostrou ser o melhor para a determinação da capacidade antioxidantes dos lúpulos Tchecos e estrangeiros em estudo, sendo que na maioria das variedades atingiu-se um intervalo de 40% à 60% de atividade antioxidante, já que como houve secagem uma parte da atividade antioxidante foi perdida no decorrer do processo, além da diminuição do conteúdo de compostos polifenóis. Observou-se também que os valores entre 70% a 80% de atividade foram obtidos pelas variedades *Saaz* e *Spalter Select*, que são designadas como variedades de aroma. Os resultados da atividade antioxidante em extrato de água quente de lúpulo cru e moído foram estatisticamente não significativos, assim como eles em pellets, porém a capacidade antioxidante do lúpulo cru diminuiu no decorrer do armazenamento de longo prazo, o que não teve efeito sobre os pellets (KROFTA *et al.*, 2008).

Sabendo que há diversos produtos de metabolismo primário como lipídeos e proteínas, e secundários como terpenos, compostos fenólicos e alcaloides e que a caracterização de lúpulo de aroma, que foram os utilizados no trabalho, tem como conteúdo uma quantidade elevada de óleo essencial, entende-se que todas as substâncias que pertencem ao lúpulo contribuem para as conclusões no extrato final e que os resultados de atividade antioxidante por DPPH relacionados as variedades testadas apresentam uma porcentagem significativa de atividade antioxidante e uma determinada diferença entre as variedades.

4.2 Atividade antioxidante medida pelo método ABTS

O ensaio ABTS original foi fundamentado através da ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio em presença de ABTS para produzir cátion radical em presença ou ausência de antioxidantes, porém essa metodologia tem sido criticada pelo fato de que os antioxidantes de reação mais rápida também podem contribuir para a redução do radical ferril mioglobina, sendo assim o formato mais apropriado é a técnica de descoloração em que o

radical é gerado diretamente em uma forma estável antes da reação com os antioxidantes. Com isso, aprimorou-se a técnica envolvendo a produção direta de cromóforo azul/verde ABTS por meio da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio, assim dependendo da atividade e da concentração do antioxidante, juntamente com a duração da reação, a adição de antioxidantes para o cátion radical pré-formado reduzem ao ABTS, tendo como resultado a extensão de descoloração como porcentagem de inibição do ABTS, o cátion radical determinado em função da concentração e o tempo calculado em relação a reatividade de trolox como padrão nas mesmas condições (RE *et al.*, 1999).

O cátion radical ABTS se caracteriza por ser um outro radical orgânico comum que tem sido usado para determinar atividade antioxidante de compostos simples e misturas complexas (ZHOU *et al.*, 2004). E apesar dos princípios que regem os ensaios do radical DPPH e do cátion radical ABTS serem semelhantes, nesse último o radical cromóforo ABTS, o qual apresenta o máximo de absorção 417 nm é obtido a partir de um ácido pela ação do persulfato de potássio. Dessa maneira sua atividade oxidante é medida pela supressão da cor do radical e queda de absorbância quando substâncias antioxidantes são adicionadas em virtude da diminuição do radical no meio. Embora o radical ABTS tenha também uma boa estabilidade, é menor que o DPPH e degrada de forma discreta ao longo do tempo (BERTOLDI, 2006).

Através do método radical ABTS, as três variedades de lúpulo já utilizadas, foram colocadas novamente levando em consideração o tempo 0 minutos e o tempo de 5 minutos e com isso obteve-se os valores de atividade antioxidante nas diferentes concentrações e variedades, dispostas no gráfico pertencente à figura 4.

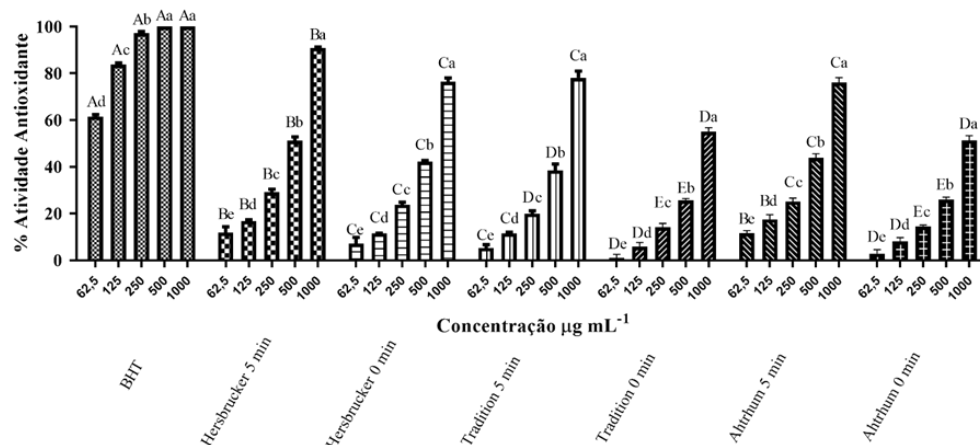


Figura 4 - Atividade antioxidante das três variedades de lúpulo (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum* nos tempos 0 e 5 minutos) e do padrão pelo método ABTS.

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

A partir do gráfico, foi possível observar que a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi mais elevada em todos os tipos de lúpulo novamente, verificando também que como comprovado no método DPPH a variedade *Hersbrucker* no tempo de 5 minutos, apresentou uma maior atividade antioxidante (90,96%), enquanto que a *Ahtrhum* no tempo 0 (51,36%) seguida pela *Tradition* tempo 0 (55,13%) tiveram as menores porcentagens, esse último, principalmente, teve uma porcentagem quase nula (0,98%) na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Analisando a menor concentração, a variedade que teve maior atividade antioxidante também foi o *Hersbrucker* em 5 minutos (11,83%), o que foi bem próximo do *Ahtrhum* 5 minutos (11,64%), sendo o menor *Tradition* 0 minutos, seguido pelo *Ahtrhum* 0 minutos (2,89%).

Houve diferenças significativas nas porcentagens de atividade antioxidante entre todas as variedades e entre as faixas de concentração em uma mesma variedade, porém nenhuma exibiu uma atividade antioxidante superior ao padrão BHT, apenas em uma porcentagem próxima, se tratando do *Hersbrucker* em 5 minutos na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, na qual BHT (100,0%) e *Hersbrucker* (90,96%). Em todas as variedades notou-se um decaimento maior da atividade antioxidante de uma concentração à outra, comparado ao ensaio de DPPH.

Novamente ao analisar as faixas de concentração do padrão e entre cada extrato, observou-se que um aumento da concentração ocasiona em um acréscimo da porcentagem de atividade antioxidante, o inverso também acontece, tanto no BHT como nas três variedades de aroma em diferentes tempos. Desse modo, os valores das atividades antioxidantes dos extratos e do padrão são menores na faixa de concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ aumentando consideravelmente até $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar de constatar a mesma situação no padrão BHT, ao se tratar das concentrações $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ nota-se uma porcentagem de atividade antioxidante igual e bem próxima na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em outras palavras, para um determinado intervalo de tempo, quanto mais diluído o extrato aquoso menor a atividade antioxidante da amostra.

Segundo Bertoldi e colaboradores (2006), ao analisar o extrato bruto do lúpulo brasileiro, com o lúpulo dos Estados Unidos, e seus consequentes óleos essenciais, observou-se que tanto para o teste de ABTS como para o DPPH os extratos obtiveram uma maior atividade antioxidante quando comparado com os óleos essenciais. Além disso, havendo amostras de lúpulo em pellets, a tendência é apresentar uma menor atividade antioxidante

comparados com as flores do lúpulo, corroborando com essa questão apresentada (BERTOLDI, 2006).

De acordo com Kowalczyk et al. (2013) o processo de “peletização” leva a perda da atividade antioxidante do lúpulo, mesmo sendo em uma quantidade muito baixa, o motivo advém da temperatura e ao oxigênio exposto que podem sofrer degradação. Além disso, seus resultados indicaram uma inferioridade do extrato aquoso comparado à extratos metanólicos e etanólicos. Tal questão deve-se provavelmente devido a uma melhor extração dos compostos fenólicos de ambos os extratos, analisando que o aquoso dispõe de um menor poder antioxidante medido pelo método ABTS (KOWALCZYK *et al.*, 2013).

Segundo Quelhas (2017) os lúpulos aromáticos em geral apresentam maior atividade antioxidante por DPPH do que os lúpulos de amargor, isso acontece por possuírem maiores quantidades de polifenóis e compostos aromáticos enquanto nos de amargor os α -ácidos estão mais presentes. Fazendo uma analogia ao lúpulo *Tradition*, equiparando à outras seis diferentes variedades de lúpulo, ele apresentou maior atividade antioxidante feito pelo ensaio de DPPH e uma das menores atividades por ABTS, o que é uma das comprovações no presente trabalho, principalmente em menores concentrações (QUELHAS, 2017).

Tratando das eficiências na utilização do método ABTS, tem-se que esse radical catiônico é solúvel em meios orgânicos e aquosos, usado em triagem lipofílica e amostras hidrofílicas, determinando a capacidade antioxidantes de vários compostos e produzindo resultados reproduzíveis, tem uma boa correlação com compostos bioativos (fenóis e flavonoides), além de que quando armazenado no escuro em temperatura ambiente é estável por mais de dois dias e refrigerado por até alguns meses, o mesmo não acontece com o ensaio DPPH, que possui uma vida muito curta. Como limitação considera-se que o radical ABTS não existe naturalmente, tendo que ser gerado quimicamente, sua reação é mais lenta comparado ao DPPH, e também possui um alto impedimento estérico em torno do seu átomo centrado em nitrogênio, fazendo com que não seja um bom modelo para radicais altamente reativos (SADEER et al, 2020).

4.3 Atividade antioxidante medida por redução do complexo fosfomolibdênio

Esse método fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) para molibdênio (V), que ocorre na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, formando então um complexo verde entre o fosfato/molibdênio (V) em pH ácido que é determinado espectrofotometricamente a 695 nm (BALESTRIN *et al.*, 2008).

Através do método de redução do complexo fosfomolibdênio, as três variedades de lúpulo já citadas, foram novamente analisadas de acordo com sua atividade antioxidante, tanto no tempo 0 minutos como no tempo 5 minutos, e seus valores obtidos podem ser visualizados no gráfico relativo à figura 5.

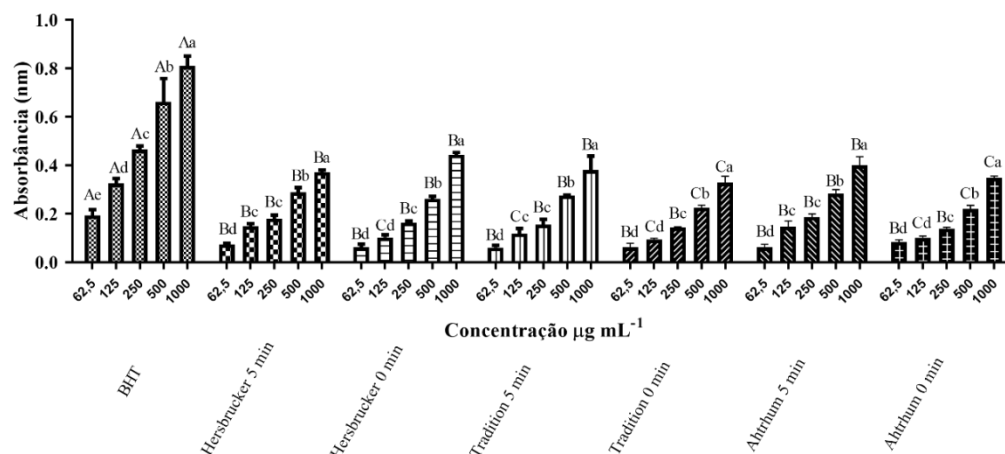


Figura 5 Atividade antioxidante das três variedades de lúpulo (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum* nos tempos 0 e 5 minutos) e do padrão pelo método redução do complexo fosfomolibdênio.

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

Com isso, observou-se que comparando todas as variedades, o menor valor de absorbância foi encontrado na variedade do lúpulo *Tradition* no tempo de 5 minutos (0,061) seguido pelo mesmo no tempo 0 (0,0623), ambos na concentração de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém relacionando com as restantes, não houve diferenças significativas com os demais valores das variedades tanto nessa concentração como nas outras. O padrão BHT foi o único que apresentou um valor significativo superior aos outros extratos e entre as concentrações do mesmo. O maior valor de absorbância esteve presente na variedade *Hersbrucker* 0 minutos (0,478), seguido pelo *Ahtrhum* de 5 minutos (0,400), ambos na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os demais tempos juntamente com as variedades não citadas apresentaram diferenças sutis entre elas e a relevância é apresentada quando comparada com o padrão BHT.

Nas demais concentrações não há diferenças significativas, no entanto, a variedade que possui menor taxa de absorbância na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é o *Ahtrhum* 0 minutos (0,138) e o maior continua sendo o *Hersbrucker* 5 minutos (0,288). Já na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os menores valores são do *Tradition* 0 minutos e os maiores preservam-se por ser *Hersbrucker* 5 minutos, porém novamente nenhuma variedade conseguiu superar ou se igualar aos valores do padrão BHT em nenhuma concentração que fora utilizada no trabalho.

Quando é feita uma análise do comportamento da absorbância em relação ao aumento da concentração, em cada variedade e ao padrão, nota-se que há uma semelhança com os métodos citados anteriormente, tendo uma tendência de aumento, na maioria das vezes significativa. Para corroborar com tal conclusão, segundo Prieto e colaboradores (1999) a redução do complexo de fosfomolibdênio é dependente da ação dos antioxidantes para formar cromogênio verde, e também da temperatura, no entanto aumentando a concentração e a atividade antioxidante maior será sua absorbância (PRIETO *et al.*, 1999).

Niknejad e colaboradores (2015) ao avaliar atividade antioxidante em extratos etanólicos (50%) de flores de lúpulo através do método de redução do complexo fosfomolibdênio, seus resultados demonstraram que ao aumentar a concentração houve também um aumento da absorbância dos extratos, testados da concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ à concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, juntamente com o padrão BHT, com uma superioridade significativa comparando aos demais, dessa maneira evidenciou uma situação parecida com a ocorrida nesse atual trabalho (NIKNEJAD *et al.*, 2015).

Baseando nos resultados de George e colaboradores (2015) analisando três extratos hidroalcoólicos de *H. lupulus* (cones), *Vaccinium myrtullus* (folhas) e um extrato combinado resultante da mistura das duas espécies, comprovou-se que no ensaio de fosfomolibdênio, o extrato de *H. lupulus* teve sua capacidade antioxidante total superior ao *V. myrtullus* em todas as concentrações testadas, diferente do ensaio de DPPH que foi feito. Tal constatação pode ser devido às diferentes reatividades dos extratos compostos pelo reagente, levando em consideração o tempo, a temperatura de reação e a complexidade química dos extratos. Portanto, essa análise pode também ser de grande interesse para as aplicações na indústria fitofarmacêutica, assim como uma nova abordagem na indústria de fabricação de cerveja (GEORGE *et al.*, 2015).

Segundo Vergun e colaboradores (2021) que realizaram essa mesma metodologia foi evidenciado que a grande maioria do conteúdo como polifenóis, flavonóides e ácidos fenólicos são encontrados nos extratos da folha do vegetal e um menor conteúdo nos caules, assim como os valores de correlação entre os grupos de polifenóis, mostrou que a atividade antioxidante pelo método de DPPH foi maior que a metodologia do fosfomolibdênio, mesmo todos tendo uma forte relação com essa capacidade antioxidante (VERGUN *et al.*, 2021).

4.4 Atividade antioxidante medida pela metodologia do poder redutor

Estudos demonstram que a capacidade de doação de elétrons pelo poder redutor de compostos bioativos está intimamente associada à atividade antioxidante e durante seu ensaio a presença de reduções nas amostras em teste resulta na redução do complexo ferricianeto (Fe^{3+}) para a forma ferrosa (Fe^{2+}), sendo esse último monitorado medindo a formação do azul da Prússia em 700 nm (NIKNEJAD *et al.*, 2015).

Os valores de absorbância referentes aos extratos, das três variedades de lúpulo nos diferentes tempos, e ao padrão BHT obtidos pela metodologia do poder redutor estão dispostas no gráfico relativo à figura 6. Diante disso, podemos avaliar que comparando-as, o maior valor de absorbância foi novamente o da variedade *Hersbrucker* no tempo de 5 minutos (0,197) na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguidos pelos valores 0,190 e 0,168 referentes as variedades *Tradition* tempo 5 e *Ahtrhum* tempo 5, respectivamente, também na mesma concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nota-se, dessa maneira, que a diferença nessa concentração foi significativa de uma variedade para outra e principalmente se comparada ao padrão, na qual o valor é de 1,128. Com menor valor nessa mesma concentração apresentou-se a variedade *Tradition* no tempo 0 (0,121).

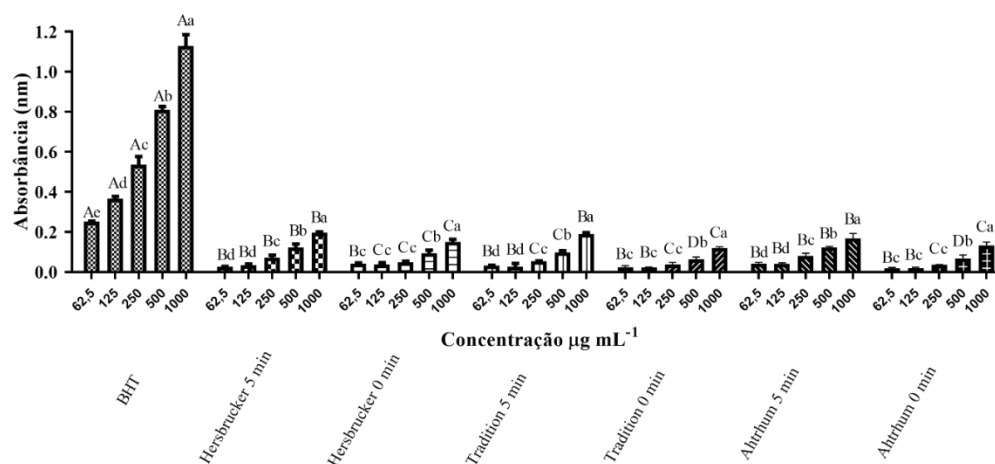


Figura 6 - Atividade antioxidante das três variedades de lúpulo (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum* nos tempos 0 e 5 minutos) e do padrão pelo método poderredutor.

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.

Entre as concentrações de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ comparando-as com cada uma das variedades, de maneira geral, não foi notada diferenças estatísticas significantes entre si, porém foram inferiores as de concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e consequentemente

de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo notório um aumento da absorbância conforme a concentração acresce.

Analisando os valores gerados pelo padrão BHT, conclui-se que estabeleceu quantidades muito superiores a todos os outros extratos em todas as concentrações testadas no trabalho, além de comparado as demais metodologias ter apresentado valores ainda mais discrepantes, mostrando que o antioxidante sintético é capaz de possuir uma maior atividade antioxidante através da metodologia do poder redutor. Comprova-se também que houve claramente um aumento da absorbância em resposta ao aumento da concentração, tanto dos extratos como do padrão, sendo que todas as concentrações mais elevadas foram significativamente maiores que as demais, porém essa diferença foi maior nas concentrações do BHT comparado as outras três variedades.

Segundo Niknejad e colaboradores (2015), tal ocorrência faz-se presente já que as características de redução estão associadas à presença de compostos doadores de elétrons, ou seja, com o aumento dos compostos fenólicos no extrato há um aumento da atividade de redução e com isso o extrato será capaz de doar mais elétrons, quebrando a reação em cadeia de formação de radicais livres, atrasando a então oxidação (NIKNEJAD *et al.*, 2015). Análogo a isso, quanto maior a absorbância obtida maior será a atividade antioxidante da amostra ou do padrão, já que a capacidade de avaliar o potencial antioxidante faz-se através da redução do sistema gerada pela capacidade antioxidante do analito (ALAM *et al.*, 2013).

Baseando nos resultados de Lermusieau e colaboradores (2001) foram testados o poder redutor de seis tipos de lúpulo em pellets, sendo o metanol escolhido para teste já que com ele é possível extrair a maioria dos antioxidantes solúveis em soluções aquosas quentes como o mosto fervente. Surpreendentemente a variedade *Sazz* geralmente reconhecida como a melhor variedade para aroma apresentou melhor poder de redução com um tempo de inibição oito vezes maior do que a amostra *Nugget*, por exemplo. Dessa maneira, chegaram em um desfecho de que quanto maior a concentração de α -ácido em pellets de lúpulo, menor o tempo de inibição, indicando que os α -ácidos não são os únicos a contribuir significadamente para o poder de redução. De modo análogo, quanto maior for o poder de redução da amostra de lúpulo, maior será o poder de redução do mosto, sendo os polifenóis os principais contribuintes para o potencial redutor do lúpulo, relacionado também a prevenção da oxidação do ácido linoléico, fonte do sabor de cerveja envelhecida (LERMUSIEAU *et al.*, 2001).

Os polifenóis de baixa massa molecular se enquadram como sendo os grandes responsáveis pelo poder redutor do mosto e das cervejas, sendo relevantes na proteção de processos oxidativos e melhorando sua estabilidade de paladar. Já os polifenóis de alta massa

molecular, contribuem para a coloração da cerveja e formação de turbidez, causada pela complexação de polifenóis com proteínas ou instabilidade coloidal (JASKULA-GOIRIS *et al.*, 2014). Um aumento do poder redutor pode ser devido às alterações na composição dos compostos fenólicos do produto, assim como o aparecimento de outros compostos redutores como produtos da reação de *Maillard*, formados durante o processo de envelhecimento da cerveja (VANDERHAEGEN *et al.*, 2006).

4.5 Compostos fenólicos totais

A metodologia de Folin-Ciocalteu para determinação da concentração de compostos fenólicos totais quantifica a massa total de compostos fenólicos presentes numa mistura e uma possível polimerização destes compostos não afetaria a sua determinação (SIQUEIRA, 2007), sendo que, de modo complementar, compostos fenólicos em muitos trabalhos estão como os antioxidantes naturais mais eficientes.

O total de compostos fenólicos presentes nos extratos de cada uma das variedades estão dispostos no gráfico referente à figura 7, sendo que o maior valor de fenólicos totais encontrado foi 105,38 mgEAG g⁻¹ referente ao *Hersbrucker* no tempo de 5 minutos, seguido pelo *Tradition* 5 minutos (93,91 mgEAG g⁻¹) e logo em seguida *Ahtrhum* 5 minutos (93,42 mgEAG g⁻¹), não havendo diferenças significantes nos dois últimos. Os menores valores foram 85,28; 69,5 e 61,95 mgEAG g⁻¹ relativos ao *Hersbrucker* 0 minutos, *Tradition* 0 minutos e *Ahtrhum* 0 minutos, respectivamente, o que denota a mesma sequência de variedades ocorrida com os maiores valores, porém em tempos distintos. De maneira geral, uma maior atividade antioxidante está diretamente relacionada com maior teor de compostos fenólicos totais, o que é comprovado principalmente através da comparação das metodologias anteriores testadas, juntamente com a análise de compostos fenólicos totais, corroborado pelo fato da variedade *Hersbrucker* possuir em todas as metodologias o maior valor comparado as outras duas variedades, relatada também principalmente no tempo de 5 minutos.

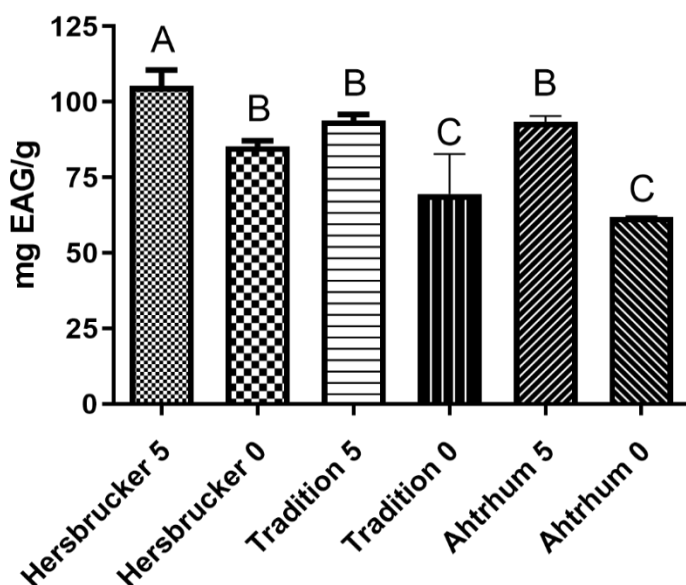


Figura 7 – Teor de compostos fenólicos totais utilizando três variedades de lúpulo (*Hersbrucker*, *Tradition* e *Ahtrhum* nos tempos 0 e 5 minutos). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Segundo estudos de Oladokun e seus colaboradores (2017), algumas cervejas produzidas com extrato de malte foram lupuladas com 3 variedades distintas de lúpulo, sendo que uma delas foi a variedade *Hersbrucker*. Para tal variedade os teores de α -ácidos e compostos fenólicos totais foram significativamente maiores, sendo que essa diferença foi devido a maior quantidade de lúpulo *Hersbrucker* que precisava atingir um amargor semelhante as demais. Além disso, notou-se que houve uma maior extração de polifenóis na cerveja a 19 °C do que a 4 °C e principalmente na cerveja com a variedade de lúpulo *Hersbrucker*, já que tal variedade é de aroma contendo pouco α -ácido e mais polifenóis que as outras constatadas (OLADOKUN *et al.*, 2017).

Corroborando a tal estudo, segundo Almeida e colaboradores (2020), ao comparar compostos bioativos de cultivares de lúpulo brasileiro com lúpulo comercial dos EUA, nota-se que de maneira geral os compostos fenólicos totais aumentaram quando a temperatura ficou próxima do ponto central, na temperatura de 52 °C e a proporção sólido/líquido foi maior. Além disso os principais compostos fenólicos encontrados em todos os extratos foi a isoquercitrina seguida pela quercetina, sendo o lúpulo brasileiro o que apresentou valores mais elevados para compostos fenólicos totais. Essas diferenças relacionadas provavelmente às condições climáticas, composições do solo e preparação da amostra, na qual a brasileira foi

lioofilizada após colheita, enquanto a americana foi em forma de pellets (ALMEIDA *et al.*, 2020), como feito nesse trabalho.

Outro estudo conduzido por Wang e colaboradores (2014) com cones de lúpulo coletados na China relatou uma alta quantidade de compostos fenólicos totais, devido principalmente a preparação, a variedade e a região de crescimento (WANG *et al.*, 2014). Em estudos feitos por Farag e colaboradores (2012) foram relatados rutina, isoquercitrina, malonato, lupulona, humulona, xanto-humol preumulona e outros na variedade Alemã *Tradition*, testada também neste presente trabalho (FARAG *et al.*, 2012).

Compostos como a humulona (figura 8), por exemplo, apresentam um anel aromático com grupos hidroxilas em sua estrutura, dessa forma como ele não foi isomerizado não houve perda desse anel aromático, tendo uma maior propensão para ressonância, que consegue estabilizar o composto oxidado, comprovando como consequência sua maior atividade antioxidante, por conta da preservação do grupamento fenol.

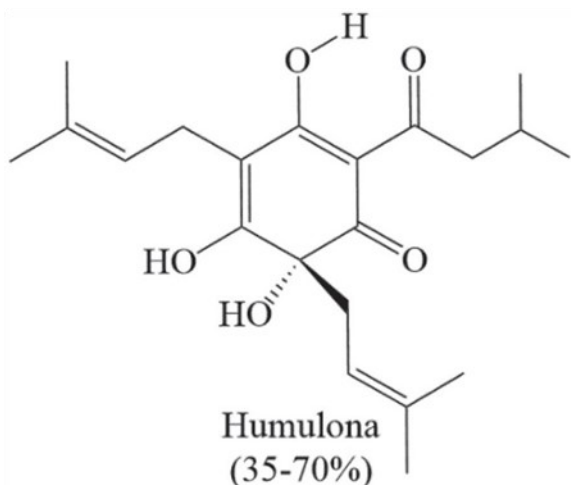


Figura 8: estrutura química da humulona

Tabela 1. Valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT (mg equivalente ao BHT por g do extrato) das 3 variedades de lúpulo analisadas

	DPPH mg EBHT g ⁻¹	ABTS mg EBHT g ⁻¹	Complexo fosfomolib. mg EBHT g ⁻¹	Poder Redutor mg EBHT g ⁻¹
Hers. 5	402,3 A	106,3 A	236,3 A	88,7 A
Hers. 0	363,3 B	82,5 B	198,5 A	59,9 C
Trad. 5	195,3 D	73,3 C	218,2 A	84,3 A
Trad. 0	114,0 E	42,3 D	147,2 B	41,4 C
Ahtrh. 5	286,7 C	87,0 B	229,7 A	70,4 B
Ahtrh. 0	103,3 E	43,3 D	142,0 B	48,7 C

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

De acordo com o apresentado na tabela, o *Hersbrucker* em 5 minutos foi o que obteve maior resultado em todas as metodologias trabalhadas relativo ao padrão BHT. São apresentados como sequência decrescente o referente as letras (A, B, C, D, E) respectivamente, corroborando então com os testes antioxidantes realizados. Antagônico a isso, a variedade com menor atividade antioxidante em dois dos quatro testes (DPPH e Complexo de fosfomolibdênio) fora *Ahtrhum* 0 minutos, sendo que no método do poder redutor e ABTS, o *Tradition* 0 minutos foi o que se apresentou com menor atividade.

5 CONCLUSÃO

Observou-se nitidamente que há uma maior relevância da atividade antioxidante do *Hersbrucker* em 5 minutos e uma menor, de maneira semelhante, tanto na variedade de *Ahtrhum* 0 minutos como *Tradition* 0 minutos. Com isso, *Hersbrucker* em 5 minutos foi o extrato que mais teve atividade antioxidante em todas as metodologias testadas e tal princípio fundamenta-se provavelmente devido a quantidade de compostos fenólicos que possui (105,38 mg EAG g⁻¹). Porém, dentre as variedades testadas, esse é o que possui menor porcentagem de α -ácidos (1,4%), não se apresentando então como contexto prioritário no potencial, contudo, por ser uma variedade de lúpulo de aroma, há outros metabólitos secundários que faz com que se estabeleçam e prevaleçam uma quantidade alta de atividade antioxidante, tendo assim uma maior relevância nesse presente estudo. Os resultados então discutidos, indicam a importância de avaliar compostos alternativos e economicamente viáveis para o combate aos radicais livres, sugerindo assim, futuros estudos para o isolamento e possíveis uso dessas substâncias na terapêutica.

REFERÊNCIAS

A Cerveja na Antiguidade. **Vilastgallen**. Disponível em: < <https://vilastgallen.com.br/cultura-cervejeira/>>. Acesso em: 19/08/21.

ALAM, M.N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALMEIDA, A. B. C. D. **Efeitos biológicos do lúpulo: Resultados de ensaios clínicos em humanos**. Revisão temática. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. Porto, p. 28, 2017

ALMEIDA E SILVA, JB. **Cerveja**. In: Venturini Filho, G. W. Tecnologia de Bebidas. Edgar Blucher, Brasil, 2005, p. 347-380.

ALMEIDA, A.R.; MACIEL, B.O.V.M.; MACHADO, H.M.; BAZZO, C.G.; ARMAS, D.R.; VITORINO, B.V.; VITALI, L.; BLOCK, M.J.; BARRETO, M.L.P. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 340-347, 2020.

ANDRADE, C.A.; COSTA, K.C.; BORA, K., MIGUEL, D.M.; MIGUEL, G.O.; KERBER, A.V. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, n.2, p 231-235, 2007.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. *Perfil sensorial e composição físico química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro*. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 121-128, 2003.

ARAÚJO, G.S. **Elaboração de uma cerveja ale utilizando melão de caroá [sicana odorífera (vell) naudim] como adjunto do malte**. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

BALASUNDRAM, N. Food chemistry phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. v. 99, p. 191–203, 2006.

BALESTRIN, L.; DIAS, G.F.J.; MIGUEL, G.O.; DALLSTELLA, G.S.D.; MIGUEL, D.M. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230-235, 2008.

BERTOLDI, M.C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius raddi*)**. 96 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BISHOP, L. R. The Measurement of Bitterness in Beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 70, n. 6, p. 489-497, 1964.

BORGES, L.L.; LÚCIO, C.T.; GIL, S.E.; BARBOSA, F.E. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. Universidade Federal de Goiás, 2011. **Enciclopédia Biosfera**. Vol. 7, N. 12.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 65, 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. 239 ed. Seção. 1, p. 31. 2019.

CARVALHO, G.B.M., ROSSI, A.A., SILVA, J.B.A Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª. parte, A fermentação. **Revista Analítica**, v. 26, p. 46 - 54, 2007.

CERVBRASIL. 2018. Anuário de 2016. **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf>. Acesso em: 15/08/21.

CHIDAMBARA-MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4791-4795, 2002.

DI SOTTO, A.; PAOLA, C.; CELESTINO, I.; LOCATELLI, M.; CARISSIMI, S.; DE ANGELIS, M.; ROSSI, V.; LIMONGI, D.; TONIOLO, C., MARTINOLI, L.; DI GIACOMO, S.; PALAMARA, T.A. Antiviral and antioxidant activity of a hydroalcoholic extract from *humulus lupulus* L. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018,

2018.

DODDS, K.A. **Hops a guide for new growers**. NSW Government. Sidney, p. 52. 2017.

DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited Review Free Radicals In Foods. **Free radical research**, v. 22, n. 2, p. 147–176, 1995.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química nova**. Revisão. v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019.

FAGHERAZZI, M.M.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; ARRUDA, A.; SANTOS, S.M.F.; CAMARGO, S.S. A cultura do lúpulo: botânica e variedades. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 4–6, 2017.

FARAG, M.A., PORZEL, A., SCHMIDT, J. & WESSJOHANN, L.A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Journal Metabolomics**, v. 8, p. 492–507, 2012.

FREITAS, G.L. **Potencial Antioxidante e Compostos Fenólicos na Cerveja, Chopp, Cevada (*Hordeum vulgare* L.) e no Bagaço de Brassagem**. 87f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GEORGE, B.; CORINA, B; GHEORGHE, C. Antioxidant activity of *Humulus lupulus* and *Vaccinium myrtillus* individual and combined extracts. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 2, p. 10277, 2015.

GOMES, M.S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero citrus e de seus componentes majoritários**. Universidade Federal de lavras. Tese de pós graduação em agroquímica, p.126, 2014.

HOELZ, I.D.S; AZEVEDO, R.S. **Análise teórico-experimental de processos de fermentação para produção de cerveja**. Graduação Bacharel em Engenharia Química. Universidade federal do fluminense, Niterói, 2019.

JASKULA-GOIRIS, B.; GOIRIS, K.; SYRYN, E.; VAN OPSTAELE, F.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; COOMAN, L. The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor

Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, v. 72, n. 3, p. 175-183, 2014.

KARABÍN, M.; JELINEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 691–706, 2018.

KEDARE, S.B. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of food science and technology**, p. 412-22. 2011.

KEMP, B. J. **Ancient Egypt: Anatomy of a Civilization**. New York: Routledge, 2018.

KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KONO, K.; SHIBATA, K. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8855-8861, 2006.

KOWALCZYK, D.; ŚWIECA M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103–110, 2013.

KROFTA, K.; MIKYŁKA, A.; HAŁKOVÁ, D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008.

LEE, R. B. Twenty-First Century Foragers. **Property and Equality. Cambridge Encyclopedia of Hunters and Gatherers**. Cambridge: University Press, 2005

LERMUSIEAU, G.; LIÉGEOIS, C.; COLLIN, S. Reducing power of hop cultivars and beer ageing. **Food chemistry**, v. 72, n. 4, p. 413-418, 2001.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotechnologia: fundamentos e aplicações**. v. 1. Lisboa: Lidel, 2003.

LIN, M.; XIANG, D.; CHEN, X.; HUO, H. Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 30, p. 8291–8302, 2019.

MACIEL, D. C.; ELÓI, L. M. H.; JORDÃO, C. D. O. Compostos Fenólicos em Diferentes Marcas de Cerveja: Comparação Qualitativa de Diferentes Marcas e Sua Relação com a Saúde Humana. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 41, 2013.

MAZUROSKI JUNIOR, Aristeu. **Bebendo Cultura: Construção da Linguagem e Epidemiologia Cultural da Cerveja**. p. 250, 2015.

MELO, J. D. S.; MAURO, F.; SOARES, P. **Produção de cerveja caseira com adição de *Syzygium malaccensis* fruta típica da região Amazônica no município de Coari-Amazonas**. v. 8, n. 01, p. 1–14, 2019.

MORAIS, F. P. R. **Digestibilidade e Atividade Antioxidante de Complexos de Isolado Proteico de Soro de Leite com Compostos Fenólicos Antes e Após a Digestão in vitro**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2017.

NETO, J. R.; OLIVEIRA, S.T.; GHEDINI, C.P.; VAZ, G.B.; GIL, S.E. Antioxidant and vasodilatory activity of commercial beers. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 130–138, 2017.

NEVE, R. A. **Hops**. 1 ed. Springer Science & Business Media, p 266, 1991

NIKNEJAD, F.; MOHAMMADI, M.; KHOMEIRI, M.; RAZAVI, S.H.; ALAMI, M. Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Flower Extracts. **Advances In Environmental Biology**, v. 24, n. 8, p. 395-401, 2015.

NOVAES, R. H.; RODRIGUES, S. A.; SARNIGHAUSEN, V. C. R.; PAI, A. DAL. **O Lúpulo e suas aplicações em bioprocessos e biotecnologia**. I Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo. São Paulo, 2019.

OLADOKUN, O.; JAMES, S.; COWLEY, K.; SMART, J.H.; COOK, D. Dry-hopping: The effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. **Brew Sci**, v. 70, p. 187-196, 2017.

OLIVEIRA, N. A. M. D. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja, p. 45, 2011. Instituto de ciências biológicas. Universidade federal de minas gerais.

PALMER, J. J. **How To Brew Everything You Need To Know To Brew Great Beer Every Time**. 4 ed. Brewers Publication. Colorado. 2017.

PAREJO, I., VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J.; CODINA, C. Comparison between the radical-scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled mediterranean herbs and aromatic plants.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 50, n. 23, p. 6882-6890, 2002.

PARTHASARATHY, S.; PARTHASARATHY, S.; AZIZI, J.B.; RAMANATHAN, S.; ISMAIL, S.; SASIDHARAN, S.; MOHD, M.I, MANSOR, S.M. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. **Molecules**. p. 3964–3974, 2009.

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, p.10677 – 10683, 2010.

PIMENTEL, C. V. M. L.; FRANCKI, K. M.; BOIAGO, A. P. **Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1ª ed., Metha, 95 p., 2005.

PIZZINO, G.; IRRERA, Na.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. **Oxidative Stress: harms and benefits for human health**. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

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

QUELHAS, F.O.J. **Avaliação do processo de dry-hopping durante a maturação de cervejas artesanais**. Dissertação (mestrado e pós graduação) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Alimentos, São José do Rio Preto, SP, 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**. v. 26, p. 1231–1237, 1999

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2008.

SADEER, B.N.; MONTESANO, D.; ALBRIZIO, S.; ZENGİN, G.; MAHOMOODALLY F.M. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. **Antioxidants**. V. 9, n. 8, p.709, 2020.

SANTOS, S. P. **Os Primórdios da Cerveja no Brasil**. 2ª edição. Ateliê Editorial. 2003.

SANTOS, V.A. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas *Humulus lupulus* (Cannabaceae)**. Universidade federal de Ouro Preto. Trabalho de conclusão de curso em farmácia. p. 14, 2018.

SCHUH, S.; PRECI, D. Matérias-primas e etapas de processamento para elaboração de cerveja. **1º Simpósio de Agronomia e Tecnologia em Alimentos**, p. 7, 2014.

SILVA, M. L., et al. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVA, H. A.; LEITE, M. A.; PAULA, A. R. V. Cerveja e sociedade. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 4, n. 2, p. 85–91, 2016.

SIQUEIRA, P. B. **Estudo da cinetica bioquimica e sensorial de diferentes tipos de cervejas brasileiras**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2007.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H.; MACEDO, G. A. O Processo de Fabricação da Cerveja e Seus Efeitos na Presença de Polifenóis. **Revista Alimentar de Nutrição**, Alimentos e nutrição Araraquara. v. 19, n. 4, p. 1–498, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: ED. Da UFRGS, 2007. 1104 p.

SOUSA, ET AL., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v.30, p.351-355. 2007.

SOUSA, M. J. DE A. C. DE. **Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L . resistentes a vírus Maria**. Universidade de Lisboa. Doutorado em biotecnologia vegetal. p. 21, 2005.

SPÓSITO M.B.; ISMAEL R.V.; BARBOSA, C.M. DE A.; TAGLIAFERRO, A. L. **A cultura do Lúpulo**. Série Produtor Rural, p. 81, 2019.

TIPOS DE CERVEJAS. Disponível em: <<http://www.montana.com.br>>. Acesso em: 05/09/2021.

TRINDADE, S.C. **Incorporação de amora na elaboração de cerveja artesanal**. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia**. São Paulo: Editora Aden, p 223, 2001.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry** v. 95, p. 357-381, 2006.

VERGUN, O.; SHYMANSKA, O.; IVANILOVÁ, E.; FISHCHENKO, V. Antioxidant Activity of Extracts of Wild Humulus lupulus L. Agrobiodiversity For Improving Nutrition, Health And Life Quality, **Slovak University of Agriculture in Nitra**, v. 5, n. 1, p. 47-54, 2021.

VIEIRA, A. C. G. et al. Atividade Antioxidante Em Cerveja Comercial De Trigo / Antioxidant Activity in Commercial Wheat Beer. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 15217–15222, 2021.

WANG, X., YANG, L., YANG, X. & TIAN, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (Humulus lupulus L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1693–1700, 2014.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4251-4260, 2014.

ZHOU, K., LAUX, J. J., YU, L. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 1118–1123, 2004.