

Valorização de resíduos da produção de cerveja como fonte de compostos bioativos antioxidantes

Valorization of residues from beer production as a source of antioxidant bioactive compounds

Lilian Tatiani Dusman Tonin^{1*}, Ana Caroline Raimundini Aranha¹, Danielli Andrea Nardino¹, Virginia Sanches Coelho de Oliveira Trindade¹, Isabella Salvat Lucas², Naiara Letícia Gatz²

¹ Programa de pós-graduação em Engenharia Química – PPGEQ - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana – Rua Marcílio Dias, 635, CEP 86812-460, Paraná – Brasil.

*liliandusman@utfpr.edu.br

² Coordenação do curso de Engenharia Química – COENQ - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana – Rua Marcílio Dias, 635, CEP 86812-460, Paraná – Brasil.

Resumo

Uma grande quantidade de resíduos sólidos provenientes da produção de cerveja é gerada anualmente no Brasil o que poderia ser usado como uma fonte potencial de compostos bioativos. O presente trabalho avaliou o trub quente de três tipos diferentes de cerveja, nomeados de acordo com o lúpulo adicionado: Bobek, Cascade e Hersbrucker. O efeito de diferentes solventes hidroalcoólicos na extração de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e habilidade quelante foi avaliado. Verificou-se que o solvente exerceu um efeito significativo nestes fatores. Quantificou-se os teores de antocianinas e flavonoides amarelos dos resíduos. Para todos estes fatores foi observado a influência do tipo de malte e lúpulo utilizado na produção das cervejas, que resultou em resíduos com diferentes quantificações destes compostos e potenciais antioxidantes distintos. Pelo coeficiente de correlação de Pearson foi possível observar uma correlação alta e positiva entre a atividade antioxidante pelos três métodos e os teores de fenólicos totais ou flavonoides. Os três resíduos apresentaram alta habilidade quelante, superior ao padrão EDTA, que pode ser atribuído a presença de compostos fenólicos e das humulonas presentes no lúpulo. Esta pesquisa demonstrou que esses subprodutos da cervejaria são uma boa fonte de compostos antioxidantes, que poderiam ter aplicações potenciais nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: mosto, extração, secagem, compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas.

Abstract

A large amount of solid waste from beer production is generated annually in Brazil, which could be used as a potential source of bioactive compounds. The present work evaluated the hot trub of three different types of beer, named according to the hops added: Bobek, Cascade and Hersbrucker. The effect of different hydroalcoholic solvents on the extraction of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity by the DPPH, ABTS and chelating ability methods was evaluated. It was found that the solvent had a significant effect on these factors. The levels of anthocyanins and yellow flavonoids in the residues were quantified. For all these factors, the influence of the type of malt and hops used in beer production was observed, which resulted in residues with different quantifications of these compounds and different antioxidant potentials. By Pearson's correlation coefficient, it was possible to observe a high and positive correlation between antioxidant activity by the three methods and the levels of total phenolics or flavonoids. The three residues showed high chelating ability, superior to the EDTA standard, which can be attributed to the presence of phenolic compounds and

humulones present in the hops. This research has shown that these brewery by-products are a good source of antioxidant compounds, which could have potential applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Keywords: wort, extraction, drying, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins.

Introdução

Diversos estudos têm associado o consumo de frutas, vegetais e seus derivados, como sucos, vinho, chás e cerveja, ricos em compostos fenólicos, com a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo [1]. Muitas pesquisas relacionadas à estrutura química dos compostos fenólicos, sua atividade antioxidante, efeitos à saúde e suas fontes estão sendo realizadas [2]. Compostos com atividade antioxidante são definidos como substâncias que, estando presente em concentrações menores que as do substrato oxidável, têm a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação deste. Estes compostos podem agir neutralizando a ação dos radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, por exemplo. Os radicais livres atacam moléculas biológicas, levando a doenças degenerativas, câncer, inflamação, aterosclerose e envelhecimento precoce [3]. Estudos comprovam que os antioxidantes, provenientes de produtos naturais e seus subprodutos, podem ser usados na também na preservação de alimentos, como suplementos ou alimentos funcionais, em cosméticos e para fins medicinais [4, 5].

O mercado cervejeiro brasileiro vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, em 2019 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registrou 1209 cervejarias registradas no país [6]. A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo e sua composição inclui substâncias bioativas como minerais, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e compostos fenólicos [7, 8]. Dos compostos fenólicos presentes na cerveja em torno de 70% são provenientes do malte, que contém catequinas, proantocianidinas e epigallocatequinas, e 30% do lúpulo, que possui flavonoides, flavan-3-ols, taninos, flavonoides prenilados, ácidos fenólicos e estilbenos, sendo responsáveis pela atividade antioxidante da bebida [9, 10].

O processo de produção da cerveja inicia-se com a mosturação, no qual o malte moído é adicionado à água, sendo a temperatura mantida entre 65 a 70°C para extração dos açúcares. Em média é possível extrair 65% dos sólidos solúveis do malte, que constituirão o mosto para a fermentação da cerveja. Em seguida, o processo de filtração separa o bagaço do malte do mosto líquido. Nesta etapa são gerados resíduos sólidos, que podem ser utilizados como ração animal [11] e incorporados em alimentos, como *snacks*, aumentando o teor de fibras [12]. Silbir e Goksungur (2019) [13] relataram seu uso na produção de pigmentos vermelhos naturais por *Monascus purpureus*. Outras aplicações para este resíduo são a produção de energia [14] e a compostagem [15].

Na terceira etapa, durante a fervura do mosto, ocorre a adição do lúpulo. Esta etapa estereliza o mosto, inativa as amilases e proteases presentes, por causar coagulação das proteínas, que se precipitam em flocos e extrai e dissolve os componentes do lúpulo. Ocorrem ainda reações químicas entre a proteína com o tanino do lúpulo e posterior coagulação. O lúpulo pode ser acrescentado quando a fervura está no início, em parcelas durante o processo, ou no final. Os óleos essenciais responsáveis pelo aroma são voláteis, apresentando mais de 200 compostos, podendo perder-se na fervura se não for devidamente controlada [16].

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) pertence à família Cannabaceae, sendo relatada a presença de ácidos amargos, constituídos de uma mistura de α -ácidos e β -ácidos (humulonas e lupulonas, respectivamente), ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido vanílico, ácido gálico e ácido siríngico, as formas glicosiladas dos flavonoides kaempferol, quercetina, morina e miricetina, os flavan-3-ols catequina e epicatequina, além de estilbenos como o *cis* e *trans*-resveratrol e prenilflavonoides, sendo o principal o xanthohumol e outras 13 chalconas relacionadas [17-20]. A quantidade de polifenóis presente depende da variedade do lúpulo [21]. Os flavonoides presentes no lúpulo apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral [22-24], antioxidante, antibacteriana e antiviral [25-27].

Após a etapa de fervura, ocorre o resfriamento do mosto, utilizando-se um trocador de calor e através de um processo chamado *whirlpool*, o qual promove através de uma centrifugação forçada a precipitação do material em suspensão ao centro do equipamento, gerando um segundo resíduo, o *trub* quente, que consiste em compostos insolúveis e produtos de condensação de polifenóis do lúpulo, proteínas do mosto e produtos de isomerização de ácidos do lúpulo, já que aproximadamente 85% do lúpulo adicionado à cerveja é descartado [28]. O'Rourke (1994) [29] relata o uso deste resíduo como fertilizante e Bedini *et al.* (2015) [30] como fonte de óleos essenciais que podem atuar como repelentes de insetos. Seu uso como suplemento alimentar animal não é viável devido à presença de 2-metil-3-buten-2-ol, produto da degradação de um ácido amargo presente no lúpulo e que tem propriedades hipnótico-sedativas [31]. O mosto, depois de resfriado adequadamente, passa para as etapas finais de fermentação, maturação e envase.

O crescimento do mercado cervejeiro vem acompanhado do aumento dos resíduos gerados durante o processo, uma vez que o descarte inadequado pode causar impactos significativos ao meio ambiente, apresentando-se como um mercado em potencial a ser explorado. Estima-se que, para a cada 100 litros de cerveja produzida, sejam gerados de 14 a 20 kg de bagaço de malte [32], 0,2 a 0,4 kg de *trub* quente [33] e 1,5 a 3 kg de levedura residual [34]. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, produzindo 14 bilhões de litros por ano [6], gerando aproximadamente 24 milhões de quilos de bagaço de malte, 420 mil quilos de *trub* quente, e 3,2 milhões de quilos de levedura residual.

Uma parte considerável dos componentes do malte e lúpulo são transferidos para o mosto, enquanto que outra parte delas é retida no *trub*. Cortese *et al.* (2020) [35] quantificaram compostos fenólicos de cervejas artesanais, produtos iniciais e seus resíduos relatando a presença destes em todas as fases da produção da cerveja. Assim, os subprodutos da cervejaria poderiam ser reintroduzidos no mercado como fonte de compostos fenólicos a serem incluídos nos alimentos, produtos de saúde, como suplementos, nutracêuticos, alimentos funcionais e cosméticos.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a influência do solvente na extração de fenólicos totais e flavonoides dos resíduos *trub* quente gerados durante a produção de três variedades de cerveja artesanal e determinar seu potencial antioxidante, buscando-se determinar se estes resíduos são fontes de compostos bioativos antioxidantes que podem ter uma futura aplicação industrial.

Metodologia

Amostras

As cervejas artesanais foram preparadas pela professora XXXX no período de maio a agosto de 2019, em duplicata. Foram preparados três tipos de cervejas diferentes, sendo apresentadas na Tabela 1 as condições específicas para cada uma delas. Os maltes moídos foram adicionados a aproximadamente 22 L de água na temperatura de 68 °C e mantidos a 64 °C por 70 minutos com agitação e recirculação. Em seguida, elevou-se a temperatura para 75 °C, mantendo-a por 10 minutos. O primeiro mosto foi reservado. Adicionou-se aos grãos aproximadamente 21 L de água, mantendo sob agitação e recirculação a 75 °C por mais 30 minutos. O segundo mosto foi adicionado junto ao primeiro e mantidos por 60 minutos em fervura. Nesta etapa foram adicionados os lúpulos na forma de pellets. As variedades utilizadas e os tempos de adição para cada tipo de cerveja estão descritos na Tabela 1. O mosto foi então resfriado, utilizando-se um trocador de calor e submetido a um *whirlpool* para decantação forçada das substâncias em suspensão. Ao atingir 25 °C o mosto foi transferido ao fermentador e o fermento indicado para cada tipo de cerveja foi adicionado (Tabela 1). O resíduo, *trub* quente, foi filtrado utilizando-se uma peneira, para remoção do excesso de líquido, sendo nomeados de acordo com a variedade de lúpulo: *trub* Bobek, *trub* Cascade e *trub* Hersbrucker.

Tabela 1. Quantidades e variedades de malte e lúpulo e tipo de fermento adicionado na preparação das cervejas.

Cerveja	Malte	Lúpulo	Fermento
Lager	5,0 Kg Malte Pilsen 0,860 g Malte Munich	Bobek: 60 min: 20,0 g 00 min: 40,6 g	Diamond Lager
Cream Ale	4,0 Kg Malte Pilsen 0,30 g Malte Chateau Melano	Cascade: 60 min: 30,0 g 10 min: 15,0 g	US-05
Weiss	4,400 Kg Malte Trigo 2,200 Kg Malte Pilsen	Hersbrucker: 60 min: 50,0 g 05 min: 25,0 g	WB-06

Fonte: Autoria própria, 2020.

Secagem dos resíduos: *trub* Bobek, *trub* Cascade e *trub* Hersbrucker

A secagem dos resíduos foi realizada em estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) na temperatura de 40 °C até seu peso permanecer constante. Após a secagem, os produtos desidratados foram triturados, armazenados e mantidos em geladeira para a realização das análises.

Extração dos compostos antioxidantes

Os produtos desidratados foram submetidos à extração com os seguintes solventes: MeOH:H₂O 70:30 (v/v), MeOH:H₂O 95:5 (v/v) e EtOH:H₂O 70:3 (v/v). Para a extração foram utilizadas 1,0000 g dos resíduos desidratados e 50,0 mL de cada solvente, durante 4 horas sob agitação magnética ao abrigo da luz (C = 20 g/L). Os extratos foram filtrados utilizando-se funil analítico e papel filtro qualitativo (80 g/m²), para balões volumétricos de 50,0 mL, o volume ajustado e armazenados sob refrigeração ao abrigo da luz para análises posteriores. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Quantificação de Antocianinas e Flavonoides Amarelos

Para a quantificação de antocianinas e flavonoides amarelos, 1,0000 g dos resíduos desidratados foram extraídos com 30 mL de uma solução de etanol 95% e HCl 1,5 M (85:15) sob agitação magnética por 5 minutos. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL, completando-se o volume com o solvente extrator e armazenada sob refrigeração por 16 horas ao abrigo da luz. Após filtração simples, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) no comprimento de onda de 535 nm para antocianinas e 374 nm para flavonoides amarelos. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram obtidos em mg por 100 g⁻¹ de resíduo através das Equações 1 e 2 [36].

$$\text{Antocianinas totais} = (\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs})/98,2 \quad (1)$$

$$\text{Flavonoides amarelos} = (\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs})/76,6 \quad (2)$$

Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de fenóis totais dos extratos foi determinado usando o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia descrita por Minussi *et al.* (2003) [37]. A um tudo de ensaio com tampa rosqueável, foram adicionados 250 µL do extrato, 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído 1:1 (v/v) em água destilada, 500 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio (35,0 g Na₂CO₃ em 100 mL de água destilada) e 4,0 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e mantidos a temperatura ambiente sob proteção da luz por 25 minutos. Após este tempo foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) na absorbância de 725 nm. Foi conduzido um branco nas mesmas condições, substituindo a amostra por 250 µL do solvente extrator. As análises foram realizadas em

triplicata. Uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ foi construída ($y = 0,005x + 0,004$; $R^2 = 0,999$) e os resultados foram expressos em mg EAG 100 g⁻¹ de amostra, onde EAG representa o equivalente em ácido gálico.

Quantificação de Flavonoides Totais

Os flavonoides totais foram determinados segundo a adaptação da metodologia descrita por Funari e Ferro (2006) [38]. A um tudo de ensaio foram adicionados 500 µL do extrato, 250 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 4,25 mL de metanol. A mistura foi agitada e permaneceu a temperatura ambiente por 30 min. Após esse tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) no comprimento de onda de 420 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão de rutina nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 200 mg L⁻¹ foi construída ($y = 0,005x - 0,021$; $R^2 = 0,995$) e os resultados foram expressos em mg de rutina 100 g⁻¹ de amostra.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH·

Para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, adicionou-se em uma cubeta 1,0 mL de extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 2,0 mL de da solução do radical DPPH (0,12 mM em MeOH). Após 30 minutos de incubação a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 517 nm [39]. A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a Equação 3, onde (Aa) representa a absorbância da amostra, (Ab) representa a absorbância do branco da amostra (1,0 mL de extrato e 2,0 mL de MeOH) e (Ac) representa a absorbância do controle (1,0 mL de MeOH e 2,0 mL de da solução do radical DPPH). Foi utilizado como padrão o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e ácido ascórbico a uma concentração de 0,1 g L⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%AA = [Ac - (Aa - Ab)] \cdot Ac^{-1} \quad (3)$$

Determinação da Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada segundo a metodologia de Rufino *et al.* (2007) [40]. Preparou-se as soluções de ABTS (192 mg em 50 mL de água destilada) e persulfato de potássio (378,4 mg em 10 mL de água destilada). Misturou-se 5,0 mL da solução de ABTS e 88 µL da solução de persulfato de potássio e após 16 h, diluiu-se com aproximadamente 70 mL de etanol, até atingir-se uma absorbância de aproximadamente $0,900 \pm 0,050$ em 734 nm, referente ao cátion radicalar ABTS⁺. Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos, foram adicionados a uma cubeta 30 µL do extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 3,0 mL de solução de ABTS⁺. Após 6 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 734 nm. A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a Equação 3, onde (Aa) representa a absorbância da amostra, (Ab) representa a absorbância do branco da amostra (30 µL de extrato e 3,0 mL de EtOH) e (Ac) representa a absorbância do controle (30 µL de EtOH e 3,0 mL de da solução do radical ABTS). Foi utilizado como padrão o BHT e ácido ascórbico a uma concentração de 0,1 g L⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da Habilidade Quelante do íon Ferro (II)

Para a determinação da habilidade quelante, foram adicionados a um tubo de ensaio, 3,7 mL do extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 0,1 mL de FeCl₂ · 4H₂O (0,004 g em 10 mL água deionizada). Foi preparado um controle negativo (A_{cont}), substituindo-se o extrato por MeOH e um controle positivo com 3,7 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,015 g L⁻¹). A primeira leitura (A₀) foi realizada espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 562 nm. Adicionou-se então a esta mistura, 0,2 mL de ferrozina (0,025 g em 10 mL de água deionizada) e depois de 10 minutos a

leitura foi realizada novamente no mesmo comprimento de onda (A_1). As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo da porcentagem da habilidade quelante do extrato foi realizado a partir da Equação 4 [41].

$$\% \text{ Habilidade quelante} = [A_{\text{cont}} - (A_1 - A_0)] \cdot A_{\text{cont}}^{-1} \quad (4)$$

Resultados e Discussão

O processo de secagem de matérias primas como, alimentos e seus subprodutos, é utilizado na sua preservação e conservação. Esta operação unitária reduz o teor de água dos produtos, minimizando a ação de micro-organismos e a ocorrência de reações químicas e bioquímicas, responsáveis pela sua degradação e perda de qualidade [42].

A temperatura de secagem é um fator importante, principalmente quando se visa manter os componentes bioativos dos produtos naturais [43]. Neste sentido, os *trubs* quente foram secos a 40 °C a fim de não degradar seus compostos. A secagem durou em torno de 48 h e com um rendimento de aproximadamente 24%.

Os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes incluem os flavonoides. A quantidade e tipo destes compostos presentes em produtos naturais e seus subprodutos, depende de fatores como espécie, método de cultivo, origem geográfica, solo, estágio de maturação, condições climáticas, processamento e estocagem [44]. Na extração dos compostos fenólicos e flavonoides, a escolha do solvente extrator é um fator muito importante. A água em combinação com outros solventes orgânicos contribui para criar um meio moderadamente polar, o que favorece a extração de polifenóis [45]. De acordo com Kowalczyk *et al.* (2013) [46], o emprego de solventes hidro alcoólicos favorece a extração de compostos fenólicos, o que justifica a escolha dos três solventes utilizados.

Os resultados das análises de fenóis totais e flavonoides totais extraídos dos três resíduos, *trub* Bobek, *trub* Cascade e *trub* Hersbrucker, com os três sistemas de solventes estão apresentados na Tabela 2.

Observa-se a influência do solvente extrator na quantidade de compostos fenólicos e flavonoides dos resíduos estudados. O melhor solvente extrator para os fenóis totais apresentou um valor superior ao solvente menos eficiente de 28%, 26% e 39%, respectivamente para os *trubs* Bobek, Cascade e Hersbrucker. Para flavonoides estes valores foram ainda maiores para os *trubs* Bobek e Cascade, sendo de 51% e 67%, respectivamente. Para o *trub* Bobek os melhores solventes foram MeOH: H₂O 70:30 e EtOH: H₂O 70:30 para fenóis, não apresentando diferença significativa, e MeOH: H₂O 95:5 para flavonoides. Para os *trubs* Cascade e Hersbrucker o solvente EtOH: H₂O 70:30 foi o mais eficiente na extração de fenóis totais. Os melhores solventes extratores para flavonoides para o *trub* Cascade foi MeOH: H₂O 95:5 e para o *trub* Hersbrucker não foi observado diferença significativa entre os três solventes estudados.

Comparando-se os três resíduos, a maior quantificação de fenóis totais foi para o *trub* Cascade (EtOH: H₂O 70:30), com valor superior aos *trubs* Bobek e Hersbrucker de 42%, quando comparado o mesmo solvente extrator. Para os flavonoides totais os maiores valores foram para os *trubs* Bobek (MeOH: H₂O 95:5) e Cascade (MeOH: H₂O 95:5), não apresentando diferença significativa, sendo 28% superior ao extraído para o *trub* Hersbrucker. Estes valores demonstram que a quantidade destes compostos bioativos nos extratos, além de estar relacionada com o solvente extrator, está relacionada com a variedade de lúpulo utilizada na produção da cerveja.

Este dado está de acordo com Biendl (2002) [47] e De Keukeleire *et al.* (1999) [48] que relacionaram a quantidade de compostos fenólicos no lúpulo, com a variedade, origem geográfica, procedimento de colheita e estocagem.

Tabela 2. Resultados de fenóis totais e flavonoides totais dos diferentes extratos de *trubs* quente.

<i>Trub quente</i>	Solvente	Fenóis totais mg EAG 100 g ⁻¹	Flavonoides totais mg ERT 100 g ⁻¹
Bobek	MeOH: H ₂ O 95:5 (v/v)	175,26 ± 13,09 ^e	225,76 ± 1,61 ^a
	MeOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	238,03 ± 0,62 ^d	188,37 ± 2,97 ^b
	EtOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	243,53 ± 6,39 ^d	109,82 ± 5,27 ^d
Cascade	MeOH: H ₂ O 95:5 (v/v)	314,12 ± 4,11 ^c	215,22 ± 2,21 ^a
	MeOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	386,24 ± 3,05 ^b	94,10 ± 1,80 ^d
	EtOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	423,27 ± 5,59 ^a	70,17 ± 2,27 ^e
Hersbrucker	MeOH: H ₂ O 95:5 (v/v)	151,80 ± 3,42 ^f	161,81 ± 1,69 ^c
	MeOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	191,60 ± 2,68 ^e	151,05 ± 7,03 ^c
	EtOH: H ₂ O 70:30 (v/v)	247,44 ± 1,61 ^d	149,99 ± 2,58 ^c

Fonte: Autoria própria, 2020.

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. EAG = equivalente de ácido gálico; ERT = equivalente de rutina.

Nossos estudos corroboram com diversos trabalhos que têm relatado a influência do solvente extrator no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides em diferentes tipos de produtos naturais, tais como gengibre (*Zingiber officinale*) [49], tansagem (*Plantago major*) [50], jiló (*Solanum gilo*) [43], boldo (*Plectranthus barbatus*) [51] e resíduos agroindustriais, como o resíduo da produção do vinho [52].

Dentro da classe de flavonoides estão as antocianinas, pigmentos muito instáveis a temperatura, pH e oxigênio [53]. Os resultados da quantificação de antocianinas e flavonoides amarelos dos três resíduos, *trub* Bobek, *trub* Cascade e *trub* Hersbrucker, estão apresentados na Tabela 3. Os valores revelam o *trub* Bobek com os maiores teores de antocianinas e flavonoides amarelos, seguido do *trub* Cascade e *trub* Hersbrucker.

Tabela 3. Valores de antocianinas e flavonoides amarelos presentes nos *trubs* quente estudados.

<i>Trub quente</i>	Antocianinas mg 100 g ⁻¹	Flavonoides Amarelos mg 100 g ⁻¹
Bobek	13,61 ± 0,25 ^a	239,26 ± 0,45 ^a
Cascade	9,48 ± 0,29 ^b	231,47 ± 0,38 ^b
Hersbrucker	5,61 ± 0,06 ^c	123,14 ± 1,36 ^c

Fonte: Autoria própria, 2020.

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Os resultados de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH, ABTS e Habilidade Quelante do íon Ferro (II) para os extratos dos resíduos estudados e os padrões BHT, ácido ascórbico e EDTA estão apresentados na Tabela 4.

Os resultados demonstram a influência do solvente extrator para os três resíduos em todos os testes de atividade antioxidante.

O método colorimétrico de sequestro do radical livre DPPH[•] baseia-se no decréscimo da absorbância a 517 nm da solução de DPPH, que sofre redução pelos componentes presentes no extrato e formação do composto difenil-picril-hidrazina, com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo [39]. O extrato EtOH:H₂O 70:30 foi o que forneceu maior potencial antioxidante pelo método DPPH para os três resíduos, sendo o *trub* Bobek o que apresentou a maior porcentagem de sequestro do radical DPPH[•] (82,21 ± 0,52 %). A análise dos resultados de atividade antioxidante dos padrões

BHT e ácido ascórbico revelam um valor superior de sequestro do radical de apenas 17 %, demonstrando o potencial antioxidante deste resíduo.

Tabela 4. Resultados das porcentagens de atividade antioxidante (%AA) dos diferentes extratos dos *trubs* quente estudados e padrões.

<i>Trub</i> quente	Solvente	DPPH	ABTS	Habilidade Quelante
Bobek	MeOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	78,58 ± 0,39 ^b	42,96 ± 0,37 ^a	86,61 ± 0,45 ^d
	MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	79,70 ± 0,45 ^b	40,44 ± 0,18 ^a	76,97 ± 0,54 ^e
	EtOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	82,21 ± 0,52 ^a	37,61 ± 0,34 ^b	96,57 ± 0,53 ^a
Cascade	MeOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	70,98 ± 0,05 ^d	31,00 ± 0,98 ^d	70,32 ± 0,54 ^f
	MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	71,55 ± 0,24 ^d	30,16 ± 0,55 ^d	96,71 ± 0,32 ^a
	EtOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	74,75 ± 0,32 ^c	25,71 ± 0,71 ^e	88,73 ± 0,22 ^c
Hersbrucker	MeOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	46,61 ± 0,68 ^e	18,25 ± 0,28 ^g	90,17 ± 0,66 ^b
	MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	45,97 ± 0,38 ^e	19,02 ± 0,50 ^g	90,80 ± 0,55 ^b
	EtOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	75,17 ± 0,66 ^c	22,80 ± 0,31 ^f	96,54 ± 0,20 ^a
Padrão				
BHT	-	99,45 ± 0,04	98,24 ± 0,04	-
Ácido ascórbico	-	99,68 ± 0,06	97,73 ± 0,10	-
EDTA	-	-	-	70,59 ± 1,34

Fonte: Autoria própria, 2020.

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. BHT = butil-hidroxi-tolueno.

O método de seqüestro do cátion radicalar ABTS^{•+} baseia-se na redução deste por compostos antioxidantes presentes no extrato e formação do ABTS, com redução da absorbância a 734 [40]. Pelo método ABTS^{•+} o *trub* Bobek também apresentou maior porcentagem de atividade, sendo os extratos MeOH:H₂O 95:5 (42,96 ± 0,37 %) e MeOH:H₂O 70:30 (40,44 ± 0,18 %) os mais ativos, não apresentando diferença significativa. Analisando os resultados dos padrões, seus valores foram em torno de 56 % superiores, demonstrando a importância destacada por Alves *et al.* (2010) [54] da escolha do método para avaliar o potencial de antioxidantes naturais.

O método de habilidade quelante do íon Fe²⁺ baseia-se na reação destes íons com a ferrozina, quanto mais os compostos antioxidantes quelarem os íons, menos estarão disponíveis para reagir com a ferrozina e menor será a absorbância a 562 nm [41]. Compostos antioxidantes que possuem esta habilidade contribuem na quelação de metais de transição, que em excesso podem levar a peroxidação lipídica com consequente lesão das membranas plasmáticas e a oxidação do DNA. Mesmo em baixas concentrações o íon Fe²⁺ induz a geração de radicais hidroxila, através da reação de Fenton, causando lesão ou morte celular [55]. Pelo método de habilidade quelante, não observou-se diferença significativa entre os três resíduos, sendo os extratos mais ativos o EtOH:H₂O 70:30 para os *trubs* Bobek (96,57 ± 0,53 %) e Hersbrucker (96,54 ± 0,20 %) e MeOH:H₂O 70:30 para o *trub* Cascade (96,71 ± 0,32 %). Esses valores são 26 % superiores aos encontrados para o padrão EDTA, demonstrando a alta habilidade destes extratos de quelar íons metálicos.

A alta habilidade quelante dos resíduos pode ser explicada pela presença dos compostos fenólicos e principalmente das humulonas presentes no lúpulo, que durante a fervura do mosto sofrem um processo de isomerização originado as iso-humulonas, formando cada uma dois diastereoisômeros na forma *cis*-iso-humulona e *trans*-iso-humulona. Sua estrutura molecular beta-tricarbonil conjugada é responsável pelas suas principais propriedades, entre elas a de quelar metais como Fe²⁺ e Cu²⁺. Além disso, relatos na literatura descrevem ainda a atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH e de inibição da peroxidação lipídica das humulonas [56-58].

Destaca-se a importância de se caracterizar os resíduos gerados a partir de produções de diferentes tipos de cerveja, que utilizam maltes e lúpulos distintos, pois são observados diferentes teores de compostos bioativos (Tabelas 2 e 3) e de resultados de atividade antioxidante (Tabela 4) quando compara-se os três *trubs* quente.

Pateiro *et al.* (2015) [59] que estudaram o efeito da adição de antioxidantes naturais, entre eles o resíduo da suspensão da fervura do mosto cervejeiro sobre alterações físico-químicas, microbiológicas e estabilidade do chouriço curado a seco e demonstraram sua eficiência como antioxidante protegendo a amostra da degradação oxidativa e da ação microbiana.

Munekata *et al.* (2016) [60] identificaram 14 compostos do mesmo extrato de resíduo da suspensão da fervura do mosto cervejeiro, sendo eles flavonoides (derivado da epi-catequina, derivado da epi-galocatequina, derivado da acacetina, quercetina-3-O-glicosídeo e catequina glicosilada, prodelfinidina B3), ácidos fenólicos (ácido cafeico hexosídeo e derivado do ácido sirínico) e os ácidos amargos (derivados da lupulona, cohumulona e humulona), podendo-se sugerir a presença de alguns destes compostos nos *trubs* quente estudados, visto o potencial antioxidante que apresentaram pelos métodos testados.

Para avaliação da correlação entre teores de compostos fenólicos e flavonoides totais com a atividade antioxidante (DPPH, ABTS e Quelante) foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson (r) (Tabela 5). O coeficiente de correlação pode ser avaliado qualitativamente da seguinte forma: se $0,00 < r < 0,30$, existe fraca correlação; se $0,30 \leq r < 0,60$, existe moderada correlação; se $0,60 \leq r \leq 1,0$, existe forte correlação [61].

Tabela 5. Valores dos coeficientes de correlação de Pearson entre o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais e atividade antioxidante.

	DPPH	ABTS	Quelante
Trub Bobek			
Fenóis Totais	0,78	-0,88	0,19
Flavonoides	-1,0	0,99	-0,74
Trub Cascade			
Fenóis Totais	0,84	-0,85	0,80
Flavonoides	-0,73	0,74	-0,90
Trub Hersbrucker			
Fenóis Totais	0,90	0,96	0,93
Flavonoides	-0,55	-0,69	-0,61

Fonte: Autoria própria, 2020.

Observa-se uma forte e positiva correlação entre os métodos de atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis ou flavonoides dos resíduos estudados, com exceção do *trub* Bobek e a atividade quelante, sugerindo que os compostos fenólicos e flavonoides presentes nesses resíduos são fontes importantes de agentes antioxidantes, de grande importância para a indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica. Estes resultados estão de acordo com Oskoueian *et al.* (2011) [62], que demonstraram alta correlação positiva entre fenólicos totais e flavonoides com a atividade antioxidante para os resíduos agroindustriais de farelo de colza, algodão e soja e Romero-Díez *et al.* (2018) [63] para borras de vinho envelhecidas.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se comprovar o potencial antioxidante *in vitro* dos resíduos *trub* quente, destacando-se o *trub* Bobek, e sugerir seu uso como fonte de antioxidantes naturais para aplicação em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Mais estudos referentes a caracterização dos principais componentes dos resíduos devem ser realizados.

Considerações Finais

O potencial antioxidante de resíduos da produção de cerveja, gerados a partir da decantação dos sólidos após a fervura do mosto, foi comprovado neste estudo. Demonstrou-se ainda a influência do tipo de malte e lúpulo utilizado na produção das cervejas, bem como do solvente extrator, na quantidade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e antocianinas, e no poder antioxidante dos *trubs* quente analisados. Estudos referentes ao uso destes na aplicação em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos devem ser realizados, bem como a caracterização de seus componentes principais.

Agradecimentos

As autoras agradecem ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa (LAMAP) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Apucarana pela disponibilidade dos equipamentos utilizados na pesquisa.

Referências

- [1] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (2005) 287–306.
- [2] Shahidi, F.; Zhong, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 112 (2010) 930–940.
- [3] Halliwell B.; Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142 (2004) 231-55.
- [4] Schieber, A.; Stintzing, F.C.; Carle, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — Recent developments, *Trends Food Sci. Technol.*, 12 (2001) 401–413.
- [5] Patel, S. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications, *Biomed. Prev. Nutr.*, 4 (2014) 23-27.
- [6] MAPA - Ministério da Agricultura, ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018 — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Governo do Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018/view>. Acesso em 30 Set 2019.
- [7] Duarte, I.F.; Barros, A.; Belton, P.S.; Righelato, R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Gil, A.M. High-resolution NMR spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer, *J. Agr. Food Chem.*, 50 (2002) 2475–2481.
- [8] Siebert, K.J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis, *J. Agr. Food Chem.*, 47 (1999) 353–362.
- [9] Dvorakova, M.; Moreira, M.M.; Dostalek, P.; Skulilova, Z.; Guido, L.F.; Barros, A.A. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectroscopy, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 398-405.
- [10] Callemien, D.; Collin, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer – a review, *Food Rev. Int.*, 26 (2010) 1–84.

- [11] Kerby, C.; Vriesekoop, F. An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries, *Beverages*, 3 (2017) 1-12.
- [12] Biele, B.C.; Marques, D.R.; Marchi, L.B.; Quelhas, J.O.F.; Chinellato, M.M.; Monteiro, C.C.F.; Monteiro, A.R.G. Produção de *snack* extrusado com adição de farinha de bagaço de malte, *Rev. Tecnol., Edição Especial* (2015) 321-326.
- [13] Silbir, S.; Goksungur, Y. Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain, *Foods*, 8 (2019) 1-14.
- [14] Keller-Reinspach, H.W. Emissions during the combustion of spent brewer's grains, *Brauwelt*, 129 (1989) 2316-2319
- [15] Stocks, C.; Barker, A.J.; Guy, S. The composting of brewery sludge, *J. Inst. Brew.*, 108 (2002) 452-458.
- [16] Sharp, F.R.; Laws, D.R.J. The essential oil of hops – a review, *J. Inst. Brew.*, 87 (1981) 96-107.
- [17] Biendl, M. Hops and health, *Tech. Quart.*, 46 (2009) 1-7.
- [18] Keukeleire, D.D.; Heyerick A.; Maes F. Production of hop extracts having oestrogenic and antiproliferative bioactivity, (2005) WO 2005058336 A1.
- [22] Pan, L.; Becker, H.; Gerhäuser, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49 (2005) 837-843.
- [19] Proestos, C.; Komaitis, M. Antioxidant capacity of hops, em "Beer in Health and Disease Prevention" (Victor R. Preedy) Cap. 45, Elsevier Inc. Academic Press, 2009.
- [20] Bocquet L.; Sahpaz, S.; Hilbert, J. L.; Rambaud C.; Riviere, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology, *Phytochem. Rev.*, 17 (2018) 1047-1090.
- [21] Kammhuber, K. Differentiating between the world range of hop varieties according to bitter compounds and polyphenols, *Hopfen Rundschau Int.*, 2005/2006 (2005) 42-46.
- [22] Pan, L.; Becker, H.; Gerhäuser, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49 (2005) 837-843.
- [23] Sun, Z.; Zhou, C.; Liu, F.; Zhang, W.; Chen, J.; Pan, Y.; Ma, L.; Liu, Q.; Du, Y.; Yang, J.; Wang, Q. Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway *in vivo* and *in vitro*, *Oncol. Lett.*, 15 (2018) 908-916.
- [24] Festa, M.; Capasso, A.; D'Acunto, C.W.; Masullo, M.; Rossi, A.G.; Pizza, C.; Piacente, S. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways, *J. Nat. Prod.*, 74 (2011) 2505-2513.

- [25] Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Ivanov, V.; McCall, M.; Frei, B.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 3876–3884.
- [26] Gerhauser, C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49 (2005) 827–831.
- [27] Di Sotto, A.; Checconi, P.; Celestino, I.; Locatelli, M.; Carissimi, S.; De Angelis, M.; Rossi, V.; Limongi, D.; Toniolo, C.; Martinoli, L.; Di Giacomo, S.; Palamara, A.T.; Nencioni, L. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from *Humulus lupulus* L, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018 (2018) 1-14.
- [28] Huige, N. Brewery by-products and effluents, em “Handbook of Brewing” (Priest, F.G., Stewart, G.G.) pp. 656–707, 2^a ed., Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006.
- [29] O’Rourke, T. Making the most of your hops, *The New Brewer*, 11 (1994) 20–33.
- [30] Bedini, S.; Flamini, G.; Girardi, J.; Cosci, F.; Conti, B. Not just for beer: Evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods, *J. Pest. Sci.*, 88 (2015) 583–592.
- [31] Huszcza, E.; Bartmanska, A.; Aniol, M.; Maczka, W.; Zolnierczyk, A.; Wawrzenczyk, C. Degradation of hop bitter acids by fungi, *Waste Manage.*, 28 (2008) 1406-1410.
- [32] Fillaudeau, L.; Blanpain-Avet, P.; Daufin, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries, *J. Clean Prod.*, 14 (2006) 463–471.
- [33] Briggs, D.E.; Boulton, C.A.; Brookes, P.A., Stevens, R. “Brewing science and practice”, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited and Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC, 2004.
- [34] Mathias, T.R.S; de Mello, P.P.M.; Sérvulo, E.F.C. Solid wastes in brewing process: a review, *J. Brew. Distilling*, 5 (2014) 1–9.
- [35] Cortese, M.; Gigliobianco, M.R.; Peregrina, D.V.; Sagratini, G.; Censi, R.; Di Martino, P. Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1612 (2020) 1-11.
- [36] Francis, F.J. Analysis of anthocyanins, em “Anthocyanins as food colors” (Markakis, P.) pp. 181-207, New York: Academic Press, 1982.
- [37] Minussi, R.C; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G.M.; Durán, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chem.*, 82 (2003) 409-416.
- [38] Funari, C.S.; Ferro, V.O. Análise de própolis, *Ciê. Tecnol. Aliment.*, 26 (2006) 171–178.
- [39] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, 22 (1995) 25-30.
- [40] Rufino, M.S.M; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez, J.P.; Calixto, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, *Comunicado Técnico Embrapa*, 127 (2007) 1-4.

- [41] Habeych, E.; Kogelenberg V.; Sagalowicz, L.; Michel, M.; Galaffu, N. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iron, *Food Res. Int.*, 88 (2016) 122-128.
- [42] Celestino, S.M.C. *Princípios de Secagem de Alimentos*, Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010.
- [43] Da Silva, C.F.G.; Suzuki, R.M.; Canesin, E.A.; Tonin, L.T.D. Otimização do processo de extração de compostos fenólicos do jiló (*Solanum gilo* Radi) e aplicação na estabilidade oxidativa do óleo de soja, *Rev Virtual Quim.*, 9 (2017) 729-739.
- [44] Silva, Q.J.; Moreira, A.C.C.G.; Melo, E.A.; Lima, V.L.A.G. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de genótipos de ciriguelas (*Spondia Purpurea* L.), *Alimentos e Nutrição*, 23 (2012) 73-80.
- [45] Lapornik, B.; Prosek, M.; Wondra, A.G. Comparison of extract prepared from plant by products using different solvents and extraction time, *J. Food Eng.*, 71 (2005) 214-222.
- [46] Kowalczyk, D.; Swieca, M.; Cichocka, J.; Gawlik-Dziki, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets, *J. I. Brewing*, 119 (2013) 103-110.
- [47] Biendl, M. Research on the xanthohumol content in hops, *Hopfen Rundschau Int.*, (2002) 72-75.
- [48] De Keukeleire, D.; De Cooman, L.; Rong, H.; Heyerick, A.; Kalita, J.; Milligan, S.R. "Functional properties of hop polyphenols. Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology", Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York, 1999.
- [49] Camargo, J.N.A.; Bertan, A.S.; Almeida, I.V.D.; Vicentini, V.E.P.; Dusman, E.; Tonin, L.T.D. Antitumoral activity, antioxidant capacity and bioactive compounds of ginger (*Zingiber officinale*), *Acta Sci. Technol.*, 42 (2020) 1-11.
- [50] Santos, K.B.; Tonin, L.T.D. Estudo da influência da temperatura de secagem e solvente extrator na capacidade antioxidante de folhas *Plantago major*, *Rev. Fitos*, 13 (2019) 200-211.
- [51] Silva, C.F.G.; Mendes, M.P.; Almeida, V.V.; Michels, R.N.; Sakanaka, L.S.; Tonin, L.T.D. Parâmetros de qualidade físico-químicos e avaliação da atividade antioxidante de folhas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae) submetidas a diferentes processos de secagem, *Rev. Bras. Pl. Med.*, 18 (2016) 48-56.
- [52] Tonetti, C.R.; Suzuki, R.M.; Tonin, L.T.D. Efeito antioxidante do extrato do resíduo da produção do vinho na estabilidade oxidativa do óleo de soja, *Braz. J. Food Res.*, 7 (2016) 1-15.
- [53] Lopes, T.J.; Xavier, M.F.; Quadri, M.G.N.; Quadri, M.B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Rev. Bras. Agroc.*, 13 (2007) 291-297.
- [54] Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.P.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, 33 (2010) 2202-2210.
- [55] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. "Free Radicals in Biology and Medicine", 3^a ed, Oxford University Press: New York, 1999.
- [56] Karabín, M.; Hudcová, T.; Jelínek, L.; Dostálek, P. Biologically active compounds from hops and prospects for their use, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15 (2016) 542-567.

- [57] Tagashira, M.; Watanabe, M.; Uemitsu, N. Biosci. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues, *Biotechnol. Biochem.*, 59 (1995) 740-742.
- [58] Simpson, W.J.J. Cambridge prize lecture. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids, *Inst. Brew.*, 99 (1993) 405-411.
- [59] Pateiro, M.; Bermúdez, R.; Lorenzo, J.M.; Franco, D. Effect of addition of natural antioxidants on the shelf-life of “chorizo”, a Spanish dry-cured sausage, *Antioxidants*, 4 (2015) 42-67.
- [60] Munekata, P.E.S.; Franco, D.; Trindade, M.A.; Lorenzo, J.M. Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. *LWT– Food Sci. Technol.*, 68 (2016) 52-58.
- [61] Callegari-Jacques, S.M. “Bioestatística: Princípios e Aplicações”, São Paulo: Editora Artmed S.A., 2003.
- [62] Oskoueian, E.; Abdullah, N.; Hendra, R.; Karimi, E. Bioactive compounds, antioxidant, xanthine oxidase inhibitory, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of selected agro-industrial by-products, *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (2011) 8610-8625.
- [63] Romero-Díez, R.; Rodríguez-Rojas, S.; Cocero, M.J.; Duarte, C.M.M.; Matias, A.A.; Bronze, M.R. Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities, *Food Chem.*, 259 (2018) 188-195.