

**Avaliação dos teores de fenólicos totais e do potencial antioxidante
durante a produção de cerveja artesanal**
**Evaluation of total phenolic content and antioxidant potential during craft
beer production**

Amanda de Fátima Bueno¹, George Augusto Veloso de Oliveira², Vivian Santana de Almeida², Gabriel Gerber Hornink², Bruno Martins Dala-Paula^{3*}

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) - ¹Instituto de Química; ²Instituto de Ciências Biomédicas;

⁵Faculdade de Nutrição, 37130-001, Alfenas-MG, Brasil. *E-mail: bruno.paula@unifal-mg.edu.br

Resumo

As cervejas são bebidas fermentadas, fontes de compostos fenólicos e flavonoides, com reconhecida função antioxidante. O objetivo deste trabalho foi determinar os teores totais destes compostos e o potencial antioxidante ao longo de diferentes etapas de produção da cerveja artesanal. As análises foram realizadas por método espectrofotométrico, sendo analisados: dois tipos de malte de cevada (*all grain* e *dry malt extract*), diferentes técnicas de extração do lúpulo, duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (US05 -neutra e WB06-fenólica) e três gravidades específicas para cada mosto 1,03 g/mL, 1,06 g/mL e 1,09 g/mL. O *dry malt extract* apresentou maiores teores de flavonoides e fenólicos totais quando comparado ao *all grain*, sem diferença significativa para o potencial antioxidante. Os extratos de lúpulo obtidos por cocção durante 10 e 60 min apresentaram os maiores teores de flavonoides, fenólicos e potencial antioxidante. De modo geral, o produto da fermentação da levedura fenólica apresentou teores superiores de flavonoides, quando em mosto de baixa e média gravidade, no entanto, o fermento neutro em mosto de média gravidade gerou teores superiores de compostos fenólicos. Além da matéria-prima utilizada, as variáveis envolvidas na mosturação, lupulagem e fermentação afetam significativamente os teores de compostos bioativos e potencial antioxidante em cerveja.

Palavras-chave: cerveja artesanal, lupulagem, mosturação, compostos fenólicos, flavonoides, potencial antioxidante.

Abstract

Beer is a fermented beverage and a source of phenolic compounds and flavonoids, with recognized antioxidant function. The objective of this work was to determine the total content of these compounds and the antioxidant potential within the different stages of craft beer production. The analyzes were performed by the spectrophotometric method, analyzing: two types of barley malt (*all grain* and *dry malt extract*), different hops extraction techniques, two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (US05 -neutral and WB06-phenolic) and three gravities specific to each wort 1.03 g / mL, 1.06 g / mL and 1.09 g / mL. Dry malt extract showed higher levels of flavonoids and total phenolics when compared to the all grain, with no significant difference in antioxidant potential. Hop extracts obtained by cooking for 10 and 60 minutes showed the highest levels of flavonoids, phenolics and antioxidant potential. In general, the fermented product of phenolic yeast showed higher levels of flavonoids, when in low and medium gravity wort. However, neutral yeast in medium gravity wort generated higher levels of phenolic compounds. In addition to the raw material used, the variables involved in mashing, hopping and fermentation significantly affect the levels of bioactive compounds and antioxidant potential in beer.

Keywords: craft beer, hopping, mashing, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant potential.

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é definida como: “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.” segundo o decreto brasileiro 9.902, de 8 de julho de 2019, permitindo também a utilização de outras matérias-primas (adjuntos cervejeiros), como arroz, milho, trigo, açúcares entre outros cereais malteados ou não.^{1,2}

Estudos apontam que a cerveja seja originária da Mesopotâmia, consumida em 6.000 a.C. para fins terapêuticos, com objetivo de evitar infecções pelo consumo de água não potável.^{3,4} No Brasil, tem-se registro da primeira produção de cerveja em 1836, vinte e oito anos após a sua chegada no país ainda colônia, trazida pela família real.² O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com cerca de 13,3 bilhões de litros por ano e uma média de consumo de 68 litros anuais por pessoa.⁵

No começo da década de 1990, houve um maior investimento nas “cervejarias caseiras”, com base no movimento do “renascimento cervejeiro” que ocorria nos Estados Unidos e na Europa. O movimento tinha como objetivo ressignificar a bebida em valores histórico, cultural, nutritivo, organolépticos, entre outros.⁶ A diferença entre a cervejaria artesanal e a industrial, está no tamanho da produção.⁷

As “cervejas de massa” – tipicamente “*American lagers*”, comumente comercializadas no Brasil, dominam o mercado, entretanto, nos últimos anos esse mercado vem caindo cerca de 2% ao ano. Apesar de ainda pequeno, é produzido no Brasil cerca de 91 milhões de litros de cerveja artesanal, que representa apenas 0,7% do mercado.⁸ O estado de Minas Gerais é o segundo maior estado em produção de cervejas especiais, sendo o maior do Sudeste, atrás apenas de Santa Catarina.⁹

As cervejas são separadas de modo geral em três grandes grupos: “*Ale*” (de alta fermentação), “*Lager*” (de baixa fermentação) e “*Lambic*” (fermentação espontânea). As cervejas do tipo *Ale* são produzidas com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, a fermentação ocorre a temperaturas entre 15 °C e 24 °C, com maturação em temperaturas entre 8 °C e 10 °C abaixo da fermentação. As cervejas do tipo *Lager* são produzidas por fermentação baixa, em faixa de temperatura inferior de 8 °C a 12 °C com duração total do processo até a maturação de 4 a 12 semanas. São elaboradas com cepas *Saccharomyces pastorianus*, sendo, geralmente, cervejas de aromas mais suaves e sabor mais leve que as do tipo *Ale*, como as *Pilsen*, a cerveja mais conhecida no mundo.¹⁰ As cervejas estilo *Lambic* são de baixo teor alcoólico, a fermentação ocorre de forma espontânea pelas leveduras das espécies *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e também bactérias como *Pediococcus* e *Lactocacillus*, ocorrendo diferentes fermentações como etanólica e láctica, de diferentes sabores e aromas.¹¹

As matérias-primas básicas para a produção de uma cerveja são: água, malte, levedura e lúpulo. O processo de produção tem início com a moagem do malte, depois a mosturação, caracterizada por uma série de alterações químicas, dentre elas, a hidrólise do amido em açúcares fermentescíveis, de proteínas e formação de compostos fenólicos, a exemplo do ácido ferúlico. Na sequência, o mosto é fervido, sendo possível realizar a lupulagem durante a fervura (há diversas técnicas de lupulagem), e resfriado, havendo precipitação de proteínas, resinas e taninos (trub). Na fermentação, a cepa é adicionada no mosto aerado (presença de O₂), à medida que se reduz o oxigênio, as leveduras iniciam a fase fermentativa (anaeróbia), liberando etanol e CO₂ e diversos outros metabólitos. Por fim, a maturação é uma fermentação secundária do material residual, que ocorre em temperaturas abaixo da temperatura de fermentação, essa etapa auxilia na clarificação e melhora do sabor.^{12,13}

As cervejas convencionais e artesanais são fontes de compostos fenólicos, a exemplo do isso alfa-ácidos, 4-hidroxipreniletanol, kampeferol, cujos teores variam de 16,4 mg/L a 100 mg/L. O ácido de maior teor encontrado na cerveja artesanal é o ácido ferúlico, ele representa de 48 a 58% dos ácidos fenólicos, oriundo principalmente do malte de trigo e de cevada.¹⁴ Esses compostos fenólicos possuem reconhecida função antioxidante, ao atuarem como doadores de prótons, neutralizando radicais livres, com a produção de compostos estáveis, interrompendo assim a cascata de propagação dos radicais livres.

Outros antioxidantes atuam impedindo a decomposição de peróxidos e hidroperóxidos, transformando-os em uma forma inativa. Além disso, algumas espécies podem quelar metais de transição, impedindo que ocorra reações redoxes e evitando os processos de oxidação.¹⁵

A maior parte dos compostos fenólicos encontrados na cerveja são provenientes do malte e do lúpulo, porém, os compostos fenólicos presentes no malte podem sofrer alterações após a etapa de fervura, gerando variações em seu perfil e teor a partir das condições empregadas no processo.^{16,17} A atividade antioxidante da cerveja pode ser comparada com a do vinho branco ou considerada maior, quando se compara volumes referentes a um mesmo teor alcoólico.¹⁸ Encontra-se na literatura, ação significativa do consumo moderado de cerveja na redução de colesterol, eliminando os fatores de risco relacionados ao consumo do álcool. A assunto ainda é controverso, embora o consumo moderado da bebida seja estabelecido ao redor de 500 mL por dia para homens e 250 mL por dia para mulheres.^{4,19}

Visando contribuir com a tecnologia de produção de cervejas artesanais como fontes de compostos funcionais, o objetivo deste trabalho foi determinar o impacto de diferentes etapas do processo de produção da cerveja artesanal como: lupulagem, gravidade específica inicial e cepa da fermentação, nos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, assim como no potencial antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as seguintes variáveis para o modelo experimental: tipo de malte de cevada (grãos ou extrato), gravidade inicial, tipo de cepa, técnicas de lupulagens.

2.1 Preparo das amostras

As etapas de lupulagem, mosturação e fermentação do mosto, todas necessárias à produção de cerveja artesanal, foram avaliadas levando em consideração a aplicação das seguintes variáveis:

2.1.1 Tipo de malte x gravidade específica inicial

Na etapa de avaliação por tipo de malte, duas variáveis foram individualmente investigadas, sendo elas: I) a gravidade específica original (OG) do mosto sem fermentação (g/mL): 1,03; 1,06; 1,09 e; II) Tipo de malte: Extrato seco do inglês *dry malt extract* (DME); somente grãos de cevada malteados (receita *all grain*).

Os mostos de DME foram preparados a partir da adição de diferentes quantidades de extrato de DME (Tabela 1), em béqueres contendo água ultrapura, em temperatura ambiente, sendo o volume final corrigido para 15 mL. A gravidade foi aferida por meio de refratômetro de luz analógico.

Os mostos fermentados *all grain*, a partir do malte Grist [84,5% de malte Pilsen (malteria Agrária); 8,45% de malte Caramunich I (malteria Weyermann), 7,04% de malte Caraaroma (malteria Weyermann)] foram preparados simulando as condições de referência da gravidade específica inicial, utilizadas na tecnologia de produção de cerveja artesanal de baixa, média e alta densidade (Tabela 2).

Os extratos *all grain* foram resultados de uma mostura isotérmica em 65 °C por 70 minutos, sendo os últimos 10 minutos utilizados para recirculação e clarificação. Em seguida, realizou-se a inativação enzimática aumentando a temperatura para 78 °C, com manutenção por mais 10 minutos, seguido de fervura. O volume final foi corrigido para 15mL.

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros avaliados na mosturação sem fermentação por *dry malt extract*.

Amostra	DME (g)	SG (g/ml)	Correspondente	Exemplos de estilos de cerveja
DME1	1,125	1,03	Cerveja de baixa OG - geralmente resulta em bebidas de baixo teor alcoólico	<i>American Light lager, Czech Pale Lager</i>
DME2	2,550	1,06	Cerveja de média OG - geralmente resulta em bebidas de médio teor alcoólico	<i>Helles bock, Czech Premium Pale Lager, Dunkles Bock, English IPA</i>
DME3	3,875	1,09	Cerveja de alta OG - geralmente resulta em bebidas de baixo teor alcoólico	<i>English Barleywine, Imperial Stout</i>

Leg.: DME: *dry malt extract*; SG: gravidade específica; OG: gravidade original, do inglês: *original gravity* (g/mL); IPA: India Pale Ale.

Tabela 2 – Descrição dos parâmetros avaliados na mosturação *all grain*, sem fermentação.

Amostra	SG (g/mL)	Correspondente	Exemplos de estilos de cerveja
AG1	1,03	Cerveja de baixa OG - geralmente resulta em bebidas de baixo teor alcoólico	<i>American Light lager, Czech Pale Lager</i>
AG2	1,06	Cerveja de média OG - geralmente resulta em bebidas de médio teor alcoólico	<i>Helles bock, Czech Premium Pale Lager, Dunkles Bock, English, India Pale Ale</i>
AG3	1,09	Cerveja de alta OG - geralmente resulta em bebidas de baixo teor alcoólico	<i>English Barleywine, Imperial Stout</i>

Leg.: AG: *all grain*; SG: gravidade específica; OG: gravidade original, do inglês: *original gravity* (g/mL).

2.1.2 Tipo de Lupulagem

A extração de aproximadamente 0,25 g de lúpulo Nugget, pellet T90, safra 2017, lote 4631, produzido em abril de 2018, com validade de abril de 2021, contendo 13,5% de alfa ácidos e 1,3 mL/100 g de óleos, foi realizada em aproximadamente 100 mL de água ultrapura, seguindo a mesma proporção utilizada na produção de cerveja no estilo *English India Pale Ale*, com equivalência de 100 g de lúpulo para cada 40 litros de bebida. Foram realizadas quatro diferentes técnicas de lupulagem, descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição das técnicas de lupulagem investigadas

Lupulagem	Tratamento
Dry hop/frio (DH)	O lúpulo foi adicionado na água em temperatura ambiente e mantido por 24h (técnica a frio para ressaltar os aromas).
L1'	Após 1 minuto de fervura, o aquecimento da água foi interrompido e o lúpulo adicionado, sendo resfriado em banho de gelo (técnica a quente para ressaltar os aromas).
L10'	Após 1 minuto de fervura, o lúpulo foi adicionado e mantido em fervura branda por 10 minutos, sendo resfriado em banho de gelo (técnica a quente para ressaltar os gostos).
L60'	Após 1 minutos de fervura da água, o lúpulo foi adicionado e mantido em fervura branda por 60 minutos, sendo resfriado em banho de gelo (técnica a quente para produção do amargor).

Os extratos foram filtrados após decantação, sendo os volumes corrigidos para o volume inicial, a fim de evitar diferenças na concentração.

2.1.3 Fermentação: cepas x gravidade específica inicial

Nesta etapa da produção de cerveja artesanal foram avaliados diferentes valores de gravidades específicas iniciais (a partir da adição de diferentes massas de DME) e duas cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 4): US05 (cepa neutra) e WB06 (cepa fenólica). As amostras preparadas consistem em cervejas prontas, não gaseificadas.

Tabela 4 – Descrição dos parâmetros avaliados na fermentação com *dry malt extract* e diferentes cepas.

Amostra	Cepa	DME (g)	OG (g/mL)
F1.1	US05	2,25	1,03
F1.2	US05	4,50	1,06
F1.3	US05	6,75	1,09
F2.1	WB06	2,25	1,03
F2.2	WB06	4,50	1,06
F2.3	WB06	6,75	1,09

Leg.: DME: *dry malt extract*, OG: gravidade original, do inglês: *original gravity* (g/mL).

Três diferentes processos fermentativos foram conduzidos com dois fermentos, US05 (cepa neutra – Fermentis) e WB06 (cepa fenólica), ambos de fermentação alta (*Ale*) da espécie *Saccharomyces cerevisiae* adquiridos da Fermentis. Os seguintes parâmetros foram seguidos em todas os processos fermentativos: temperatura de inoculação de 25 °C, taxa de inoculação de 0,75 milhões de células/mL/°P, temperatura de fermentação de 17 °C (4 dias), descanso de diacetil a 20 °C (2 dias), maturação de 3 dias a 9 °C e 1 dia em 1 °C. O volume final foi corrigido para 30 mL.

2.1.4. Cerveja artesanal

Um lote de cerveja artesanal do tipo “Ale”, estilo California Common, foi produzido a partir de:

- 86% de malte Pilsen, 7% de malte Caramunich I e 7% de malte Caraaroma;
- Lúpulos: Chinook 9,98% alfa ácidos, inseridos 20 g nos 5 min. finais da fervura e 30 g adicionados ao desligar a fervura e, para amargor, 35 g de H. Magnum, 12,4% alfa-ácidos;

Foram realizados os seguintes procedimentos: moagem dos grãos; mosturação em rampa isotérmica em 66 °C por 60 min., *mashout* em 78 °C por 10 min. e fervura por 60 min.; resfriamento por *chiller* de placas (40 placas); fermentação com levedura S-04 em 18 °C por 4 dias; guarda quente por 2 dias em 21 °C; maturação em 10 °C por 14 dias e *coldcrash* em 3°C por 2 dias. O envase foi realizado por *priming* para gaseificação. A cerveja preparada foi armazenada sob temperatura de refrigeração a 4 °C ± 1 °C até o momento das análises químicas.

2.2 Análises espectrofotométricas

2.2.1 Determinação de flavonoides totais

Para análise de flavonoides, em tubos de ensaio foi adicionado 250 µL da amostra com 1 mL de água destilada, 75 µL de NaNO₂ (5% m/v), homogeneizado e incubado em temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, foram adicionados 75 µL de AlCl₃ (10% m/v), sendo repetidos os processos de homogeneização e incubação. Por fim, foram adicionados 0,5 mL de NaOH (1 mol/L), sendo a solução homogeneizada e incubada por mais 5 min.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro BelPhotonics Ultraviolet / Visible-M51 (Bel) em comprimento de onda de 510 nm. Soluções “branco”, substituindo as amostras por água ultrapura e mantendo os demais reagentes conforme a metodologia aplicada foram preparadas e descontadas do resultado encontrado. Os teores totais de flavonoides foram calculados a partir da equação da reta, obtida por meio de uma curva padrão de catequina com 6 pontos.²⁰

2.2.2 Determinação de fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados a partir da adição de 50 µL da amostra em um tubo de ensaio contendo 250 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada durante 1 min., sendo em seguida, acrescentada de 1,0 mL de Na₂CO₃ (7% m/v) e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 750 nm. Soluções “branco”, substituindo as amostras por água ultrapura e mantendo os demais reagentes foram preparadas e descontadas do resultado encontrado.²⁰

2.2.3 Determinação do potencial antioxidante

Através do método de descoloração por radical catiônico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) por meio de sua neutralização a partir dos compostos com atividade antioxidante da amostra, foi determinado o potencial antioxidante, *in vitro*, das amostras. A diferença de coloração entre a solução 100% de radicais ABTS (750 µL de ABTS + 250 µL de água ultrapura) e a solução de radicais ABTS + amostra (750 µL de ABTS + até 250 µL de amostra e água ultrapura).

O potencial antioxidante foi calculado a partir da equação da reta obtida em uma curva padrão de Trolox, construída a partir de uma faixa de sete pontos entre as concentrações de 0 a 7 nmol. Soluções “branco”, substituindo as amostras por água destilada e mantendo a solução de ABTS foram preparadas e descontadas dos resultados obtidos.²⁰

2.3 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas, sendo realizada três leituras no espectrofotômetro para cada repetição. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os teores totais de compostos fenólicos e o potencial oxidante de uma cerveja estão relacionados à matéria-prima, fonte de bioativos, escolhida para a produção, e, principalmente à tecnologia de produção utilizada, e algumas variáveis envolvidas em cada etapa do processo.²¹ Apresenta-se na tabela 5 os teores totais de flavonoides, compostos fenólicos e o potencial antioxidante em maltes com diferentes gravidades específicas, obtidos por duas técnicas distintas de produção: com *dry malt extract* (DME); com grãos moídos - *all grain* (AG) em três diferentes gravidade específicas iniciais.

Ao se comparar as diferentes técnicas de mosturação (DME e AG), foi observado teores superiores de flavonoides e fenólicos totais no malte produzido por DME. No entanto, não foi observado diferença significativa entre o potencial antioxidante obtido em mostos produzidos por meio de diferentes técnicas. A semelhança no potencial antioxidante de ambos os maltes pode estar relacionada com outros componentes bioativos presentes na amostra, a exemplo das poliaminas, espermidina e espermina e da monoamina, triptamina, que apresentam reconhecida atividade antioxidante^{22,23} e presentes em cerveja.^{24,25}

Tabela 5 – Teores de flavonoides, fenólicos totais e potencial antioxidante para mosturação.

ID	Tipo de malte	Gravidade original (g/mL)	Flavonoides totais ($\mu\text{g EC/mL}$)	Fenólicos totais ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Potencial Antioxidante ($\mu\text{mol ET/mL}$)
F1.1	AG	1,03	138,78 ^f $\pm$ 2,25	175,45 ^f $\pm$ 7,09	0,91 ^c $\pm$ 0,02
F1.2	AG	1,06	201,82 ^d $\pm$ 1,85	348,62 ^d $\pm$ 6,90	3,06 ^b $\pm$ 0,34
F1.3	AG	1,09	283,09 ^c $\pm$ 5,38	528,70 ^b $\pm$ 8,64	5,84 ^a $\pm$ 0,26
F2.1	DME	1,03	186,63 ^e $\pm$ 0,83	207,97 ^e $\pm$ 5,06	1,07 ^c $\pm$ 0,02
F2.2	DME	1,06	299,04 ^b $\pm$ 7,80	416,91 ^c $\pm$ 22,29	3,67 ^b $\pm$ 0,37
F2.3	DME	1,09	384,10 ^a $\pm$ 7,89	570,16 ^a $\pm$ 11,37	5,51 ^a $\pm$ 0,52

Leg.: ID: identificação; AG: *all grain*; DME: *dry malt extract*. EC: equivalente em catequina; EAG: equivalente em ácido gálico; ET: equivalente em trolox.

Foram observados teores crescentes de flavonoides compostos fenólicos e potencial antioxidante, a partir do aumento dos valores de gravidade específica para ambos os tipos de maltes investigados (DME e AG). A gravidade específica dos maltes obtidos contribuiu de forma mais significativa com o aumento dos teores de compostos fenólicos totais e com o potencial antioxidante, enquanto o tipo de mosturação (DME e AG) afetou de forma mais pronunciada os teores de flavonoides totais, sendo aproximadamente 35% superiores nos maltes DME, em comparação aos maltes AG.

O malte de cevada ou trigo são considerados as maiores fontes de compostos fenólicos da cerveja, são responsáveis por cerca de 70-80% dos fenólicos presentes na bebida. Os polifenóis, o ácido

gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido cafeico são comumente encontrados no malte de cevada. Entretanto, a temperatura de fervura do mosto pode gerar alterações nesses compostos dificultando sua caracterização e quantificação.²¹ A casca do malte de cevada é parte do grão que contém maior concentração de compostos fenólicos, no entanto, ela é removida ao final da mosturação, durante a clarificação do mosto, por meio de sua filtração.²⁶

Os resultados obtidos neste trabalho foram inferiores ao relatado na literatura, correspondentes à 1,30 mg EAG/mL de fenólicos totais e resultados superiores de flavonoides correspondente à 0,14 mg EC/mL.^{21,26} Porém, durante a mosturação, o perfil e teores dos compostos fenólicos extraídos do mosto dependem também de outras variáveis, como a temperatura empregada neste processo, do tipo de cereal utilizado e da técnica de maltagem, sendo assim, as comparações realizadas com a literatura são passíveis de grandes variações.²¹

A etapa subsequente na fabricação da cerveja é fervura e, geralmente, com a adição do lúpulo, que então é fervido com o mosto. Neste trabalho foi realizado um processo de extração do lúpulo, separado do mosto, para que fosse possível analisar o impacto de diferentes técnicas de lupulagem nos teores de compostos fenólicos, flavonoides totais e no potencial antioxidante. Apresenta-se na Tabela 6 os resultados obtidos para as análises mencionadas, a partir de quatro técnicas de extração realizadas para o lúpulo.

Tabela 6 – Teores de potencial antioxidante, flavonoides e fenólicos totais para lupulagem.

Amostra	Flavonoides totais ($\mu\text{g EC/mL}$)	Fenólicos totais ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Potencial antioxidante ($\mu\text{mol ET/mL}$)
DH	17,88 $\pm$ 0,55 ^d	26,45 $\pm$ 2,02 ^c	0,56 $\pm$ 0,07 ^c
L1'	23,07 $\pm$ 0,67 ^c	30,62 $\pm$ 3,67 ^c	0,69 $\pm$ 0,07 ^{bc}
L10'	26,63 $\pm$ 1,06 ^b	37,93 $\pm$ 0,90 ^b	0,75 $\pm$ 0,09 ^b
L60'	27,63 $\pm$ 0,33 ^b	40,78 $\pm$ 2,94 ^b	1,04 $\pm$ 0,23 ^b

Leg.: DH: Dry Hop; L1': um minuto de fervura; L10': dez minutos de fervura e L60': sessenta minutos de fervura. EC: equivalente em catequina; EAG: equivalente em ácido gálico; ET: equivalente em trolox.

De forma geral, o aumento do tempo de cocção do lúpulo contribuiu com o aumento dos teores de flavonoides, fenólicos e com o potencial antioxidante. Os teores de flavonoides variam de 17,88 a 27,63 $\mu\text{g EC/mL}$, sendo os menores teores observados na lupulagem realizada a frio (DH), enquanto os maiores teores observados na extração com manutenção da fervura por 10 (L10') e 60 minutos (L60'). Os teores de fenólicos totais apresentaram comportamento semelhante ao observado para os flavonoides, variando cerca de 14,33 $\mu\text{g EAG/mL}$ entre a extração a frio, com o menor valor, comparado à extração L60', que também não diferiu significativamente da extração L10'. Os maiores resultados para o potencial antioxidante também foram encontrados para os extratos de lúpulo obtidos pela manutenção da fervura por 1, 10 e 60 minutos, sem diferença significativa entre eles.

É importante destacar, que além dos parâmetros destacados, existem outros que não foram analisados e que possivelmente interfeririam mais significativamente na aceitação da bebida final, a exemplo das características sensoriais.

Além dos parâmetros estudados (técnica de extração do lúpulo) a cultivar do lúpulo é outra importante variável nos teores de fenólicos totais. Há registros na literatura de teores de compostos fenólicos superiores no lúpulo Saaz, quando comparado ao Nugget, sendo a concentração de compostos fenólicos no lúpulo, inversamente proporcional a concentração de alfa-ácidos presentes no vegetal.²¹

Os alfa-ácidos são responsáveis pelo amargor da cerveja. As humulonas sofrem isomerização na etapa de fervura gerando iso-alfa-ácidos ou iso-humulonas, que são caracterizadas pelo amargor. Sua estrutura conjugada possibilita quelar metais e consequentemente aumenta o potencial antioxidante da cerveja. No entanto, a metodologia utilizada neste trabalho para determinação do potencial antioxidante,

consiste na neutralização do radical catiônico ABTS, sendo pouco sensível para as alterações proporcionadas pelos teores de iso-alfa-ácidos e iso-humulonas encontradas nos extratos. A densidade do mosto afeta a solubilização das iso-humulonas. Quanto maior a gravidade maior a concentração de açúcares fermentáveis. Esses açúcares também formam ligações de hidrogênio com a água, diminuindo a quantidade da mesma para isomerização das humulonas.²⁷

O lúpulo apresenta em média 4% de sua massa seca em compostos fenólicos. Os mais encontrados são a quercetina, kaempferol, morina e miricetina.^{14,27}

A última etapa do processo de produção da cerveja analisada foi a cepa para fermentação, onde há considerável produção de etanol, glicerol, ácido láctico, dióxido de carbono e alguns ácidos orgânicos.¹⁴ Para esta variável foram usados dois tipos de fermentos, o US05 (neutra) e o WB06 (fenólica), no mosto preparado com DME nas gravidades baixa (1,03 g/mL), média (1,06 g/mL) e alta (1,09 g/mL). Ambas as cepas são de alta fermentação (*Ale*), da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos para flavonoides, fenólicos e potencial antioxidante são apresentados na Tabela 7.

Considerando os diferentes fermentos utilizados, o produto obtido pela fermentação do mosto de baixa e média gravidade pela cepa WB06, apresentou teores superiores de flavonoides totais. Por outro lado, a fermentação realizada em alta gravidade apresentou teores semelhantes de flavonoides totais para ambos os fermentos.

Não houve diferença significativa nos teores de compostos fenólicos totais e no potencial antioxidante nos produtos obtidos a partir da fermentação com ambas as cepas, com exceção do mosto de média gravidade fermentado pela cepa US05, que apresentou teor médio superior ao observado na fermentação com WB06.

Tabela 7 – Teores de flavonoides, fenólicos totais e potencial antioxidante para fermentação.

Amostra	Gravidade específica (g/mL)	Flavonoides totais (µg EC/mL)	Fenólicos totais (µg EAG/mL)	Potencial Antioxidante (µmol ET/mL)
F1.1	1,03	94,73 ^e ± 2,09	110,81 ^d ± 6,14	0,62 ^c ± 0,02
F1.2	1,06	148,15 ^c ± 2,19	321,38 ^b ± 10,57	1,13 ^b ± 0,01
F1.3	1,09	185,11 ^a ± 1,94	381,95 ^a ± 11,15	1,76 ^a ± 0,35
F2.1	1,03	115,75 ^d ± 3,97	123,82 ^d ± 5,69	0,62 ^c ± 0,01
F2.2	1,06	164,35 ^b ± 2,19	259,59 ^c ± 7,90	1,03 ^b ± 0,02
F2.3	1,09	191,19 ^a ± 4,57	380,33 ^a ± 4,88	1,56 ^a ± 0,22

Leg.: F1: mosto fermentado com *Sacharomyces cerevisiae* US05; F2: mosto fermentado com *Sacharomyces cerevisiae* WB06. EC: equivalente em catequina; EAG: equivalente em ácido gálico; ET: equivalente em trolox.

Os diferentes valores de gravidade original nos mostos foram responsáveis pelas maiores diferenças em todos parâmetros analisados. O mosto fermentado com baixa gravidade original foi aquele que apresentou menores teores, enquanto o de alta gravidade, os maiores teores. Considerando a fermentação do mosto de alta e baixa gravidade, com ambos os fermentos estudados, houve aumento médio aproximado de 1,8 vezes para os teores de flavonoides totais, de 3,26 vezes para os teores de compostos fenólicos totais e de 2,68 vezes para o potencial antioxidante (Tabela 7).

As diferenças nos teores de flavonoides totais apresentadas entre as fermentações das diferentes cepas podem estar relacionadas com a ocorrência de polimerização de catequinas e epicatequinas²¹, além do consumo ou produção diferencial desses compostos pelas leveduras investigadas. Por outro lado, a diferença nos teores de fenólicos totais observada na fermentação dos mostos de média gravidade pelas diferentes cepas de leveduras, pode estar relacionada com o consumo aumentado de ácido ferúlico ou de outros ácidos fenólicos pela levedura WB06. A levedura fenólica (WB06) converte o ácido ferúlico em 4-vinil-guaiacol, que é responsável pelo sabor de cravo, normalmente indesejável para as cervejas de cevada, sendo considerado sabor mais típico para as cervejas de trigo. Esse efeito pode ser controlado com a temperatura, quanto maior a temperatura de fermentação mais ácido ferúlico a levedura irá

consumir.^{28,11} No entanto, de forma geral, os teores de compostos fenólicos aumentam após a fermentação.²⁶ O tempo e a temperatura de fermentação são outros parâmetros importantes de serem observados e que podem afetar a produção ou consumo de compostos fenólicos, e, conseqüentemente, no potencial antioxidante de cervejas.^{21,28}

Ao final da fabricação da cerveja, após fermentação, ainda há resíduos de açúcares não fermentescíveis, fermento e diversos metabólitos da fermentação, que durante o período de maturação continuam sendo metabolizados, a partir do processo denominado de fermentação secundária ou maturação, podendo gerar um ligeiro aumento na concentração de compostos fenólicos.¹⁴

A cerveja artesanal preparada, apresentou teor médio de flavonoides totais de 45,16 µg EC/mL (Figura 1), valor superior ao encontrado na literatura para cervejas convencionais de diferentes tipos: de trigo clara e escura, de cevada clara e escura e orgânica de cevada clara de diferentes marcas, que variaram de 1,91 a 5,09 µg EC/mL. Por outro lado, a cerveja artesanal analisada, apresentou teores de fenólicos totais inferiores ao reportado para as diferentes cervejas tradicionais, que variaram de 249,73 a 808,58 µg EAG/mL.

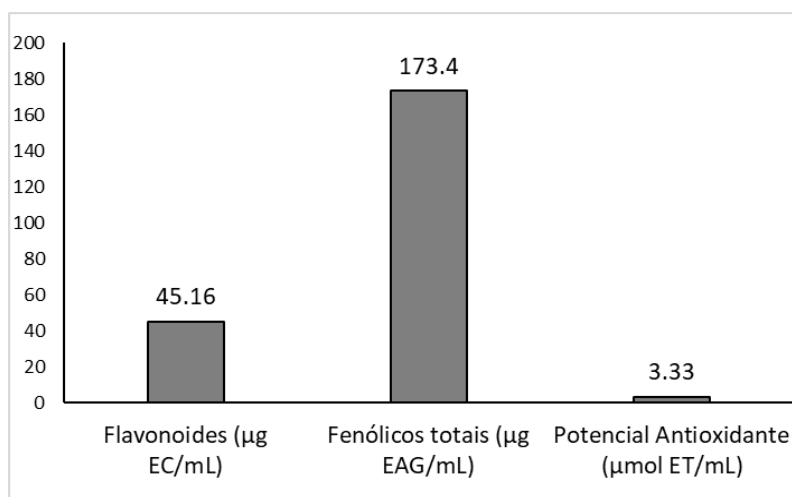


Figura 1 – Teores de flavonoides, compostos fenólicos e potencial antioxidante em cerveja artesanal.

O potencial antioxidante, *in vitro*, determinado a partir da neutralização do radical catiônico ABTS, foi superior ao de muitas amostras de cervejas convencionais reportadas na literatura, com valores variando de 0,91 a 3,19 µmol ET/mL, sendo inferior apenas a uma marca de cerveja de trigo escura (3,86 µmol ET/mL) e de cerveja de cevada escura (3,52 µmol ET/mL).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as diferentes variáveis pesquisadas neste trabalho, duas variações de tipos de malte, o *all grain* e o *dry malt extract*, sendo ambos de cevada, um único tipo de lúpulo (Nugget), duas cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, a US05 (neutra) e a WB06 (fenólica) e três gravidades diferentes para cada mosto 1,03 g/mL, 1,06 g/mL e 1,09 g/mL (baixa, média e alta), pode-se afirmar que o potencial antioxidante e os teores de compostos bioativos da cerveja artesanal, flavonoides e fenólicos totais, não são afetados apenas pela matéria-prima selecionada e sua qualidade, mas também, pelas técnicas empregadas durante o processo de fabricação.

Portanto, além de ser possível realizar o manejo na tecnologia de produção de cervejas artesanais com base nas características sensoriais desejadas, pode-se também produzir uma bebida com vantagens funcionais à saúde, a partir dos flavonoides, compostos fenólicos e potencial antioxidante. Esse estudo

possibilitou a identificação e análise de alguns parâmetros importantes para a otimização na obtenção de uma bebida alcoólica fermentada, fonte de compostos bioativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Pró Reitoria de Extensão (PROEX) e Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo apoio ao projeto de extensão: “Cerveja com Ciência” e às atividades de pesquisas que contribuíram para a realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

- [1] J.B.A. Silva. Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blucher, (2005) 347-380.
- [2] BRASIL. Decreto nº 9.902, de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 8 de julho de 2019.
- [3] R.H. Ferreira, M.C.R.L. Vasconcelos, V.M.M. Judice, J.T.R. Neves. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. Perspectivas em Ciência da Informação, 16 (2011) 171-191.
- [4] N.A. Rosa, J.C. Afonso. A Química da Cerveja. Química e Sociedade, 37 (2015) 98-105.
- [5] SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE CERVEJA. Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>. Acesso em: 8 ago. 2020.
- [6] V.V. Giorgi. “Cultos em cerveja”: discursos sobre a cerveja artesanal no Brasil. Sociedade e Cultura, 18 (2015) 101-111.
- [7] H.A. Silva, M.A. Leite, A.R.V. Paula. Cerveja e Sociedade. Contextos da Alimentação, 4 (2016) 85.
- [8] P.R.M. Lopes, E.M. Morales, R.N. Montagnolli. Cerveja brasileira: do campo ao copo. Agronomia Brasileira, 1 (2017).
- [9] R.E.O. Mac Leod, D.C. Cardoso, J.L.A. Martins, P.G. Chagas, C.R. Pinheiro. Viabilidade econômica de instalação de microcervejaria em Belo Horizonte-MG com base no perfil de consumo de cervejas artesanais no Brasil. Society and Development, 9 (2020).
- [10] A.H. Varnam, J.P. Sutherland. Bebidas. Espanha: Acribia, (1997) 487.

- [11] G.G. Hornink, G. Galembeck. Glossário cervjeiro: da cultura à ciência. Alfenas: Universidade Federal de Alfenas, 2019. Disponível em: https://www.unifal-mg.edu.br/bibliotecas/system/files/imce/glossario_cervejeiro_2019_tela.pdf. Acesso em: 27 ago. 2020.
- [12] G.G. Stewart A brewer's delight. Chem. Ind., 6 (2000) 706-709.
- [13] W. Kunze. Technology brewing and malting. Berlin: VLB, (1997) 433-435.
- [14] P.B. Siqueira, H.M.A. Bolini, G.A. Macedo. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. Alimentos e Nutrição, Araraquara, 19 (2008) 491-498.
- [15] G.L. Freitas. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare* L.) e no bagaço de brassagem. (2006). Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.
- [16] A. Lugasi Polyphenol content and antioxidant properties of beer. Acta Alim., 32 (2003) 181-192.
- [17] C. Gerhauser. Beer constituents as potential chemopreventive agents. Eur. J. Cancer, 41 (2005) 1941-1954.
- [18] S. Gorinstein, A. Caspi, M. Zemser, S. Trakhtenberg. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. Nutr. Res., 20 (2000) 131-139.
- [19] M. Bobak, Z. Skodova, M. Marmot. Effect of beer drinking on risk of myocardial infarction: population based case-control study. Br. Med. J., 20 (2000) 1378 -1379.
- [20] B.M. Dala-Paula, T.P. Santos, L.S. Araújo, R.R.A. Bastos, J.O. Moraes, N. Carbonera. Domestic processing and storage on the physical-chemical characteristics of acerola juice (*Malpighia glabra* L.). Food Science and Technology, (2019).
- [21] D. Šibalić, M. Planinić, A. Jurić, A. Bucić-Kojić, M. Tišma. Analysis of phenolic compounds in beer: from raw materials to the final product. Chem. Pap. (2020).
- [22] E.N. Bentz, R.M. Lobayan, H. Martínez, P. Redondo, A. Largo. Intrinsic antioxidant potential of the aminoindole structure: a computational kinetics study of tryptamine. The Journal of Physical Chemistry, 122, (2018) 6386–6395.
- [23] A.K. Handa; T. Fatima, & A.K. Mattoo. Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. Frontiers in Chemistry, 6 (2018) 1–18.
- [24] E. Miao, N. Zhang, S. Lu, Y. Hu, L. Fu, H. Zhou, J. Zhan, M. Wu. Solid phase “on-situ” quadruplex isotope dimethyl labeling for the analysis of biogenic amines in beers by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1613 (2020), 460-712.
- [25] J. Pradenas, O. Galarce-Bustos, K. Henríquez-Aedo, R. Mundaca-Urbe, M. Aranda. Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. Food Control, 70 (2016), 138-144.

- [26] M. Cortese, M.R. Gigliobianco, D.V. Peregrina, G. Sagratini, R. Censi, P. Di-Martino, Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* (2019)
- [27] R.S. Durello, L.M. Silva, S. Bogusz Jr. Química do lúpulo. *Química Nova*, 42 (2019) 900-919.
- [28] S. Holt, V. Mukherjee, B. Lievens, K.J. Verstrepen, J.M. Thevelein. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72 (2018) 55-66.