



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
NÚCLEO DE BIOQUÍMICA NUTRICIONAL – NBqN
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA - LABIOTEC

Roberta Nogueira Pereira da Silva

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CERVEJAS ARTESANAIS E
SUA ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Rio de Janeiro

2021

Roberta Nogueira Pereira da Silva

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CERVEJAS ARTESANAIS E
SUA ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Furtado Dias

Rio de Janeiro

2021

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

S586 Silva, Roberta Nogueira Pereira da
Avaliação de compostos fenólicos em cervejas artesanais e sua estabilidade durante o armazenamento / Roberta Nogueira Pereira da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.
85 f.

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.
Coorientadora: Juliana Furtado Dias.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2021.

1. Compostos bioativos. 2. Cervejas artesanais. 3. Cromatografia líquida. 4. Espectrometria de massas. 5. Atividade antioxidante. I. Koblitz, Maria Gabriela Bello, orient. II. Dias, Juliana Furtado, coorient. III. Título.

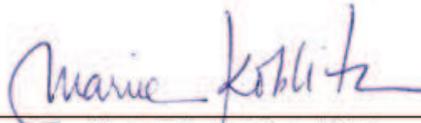
Roberta Nogueira Pereira da Silva

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CERVEJAS ARTESANAIS E
SUA ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovada em 29 de abril de 2021

BANCA EXAMINADORA



Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz
Presidente



Dra. Elisa d'Avila Costa Cavalcanti
1ª Examinadora



Dr. Marco Antônio Lemos Miguel
2º Examinador



Dr. Annibal Duarte Pereira Netto
3º Examinador

Dedico a todas as pessoas que me apoiaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram dessa jornada, são muitos agradecimentos. Não foi um caminho fácil de percorrer, mas foi uma trajetória de muito aprendizado, desafios e experiências que levarei para a vida.

Agradeço muito aos meus pais, que sempre torceram por mim, ao João, meu parceiro, amigo e companheiro de vida que me ajuda em tudo. E também, o apoio de todos os meus amigos.

Agradeço a Juliana Dias, parceira de faculdade que reencontrei “ao acaso” e iniciamos esse projeto muito desafiador, obrigada pelo apoio e incentivo. Sem esse incentivo teria sido muito mais difícil retornar para a vida acadêmica.

Agradeço a professora Maria Gabriela que me recebeu e acolheu com a maior paciência, aprendi muito e continuo aprendendo com ela.

Novas amizades também surgiram, a querida Ingrid que no nosso primeiro bate papo parecia que já nos conhecíamos há muito tempo, me ajudou nos momentos de insegurança e dúvidas e nos tornamos uma dupla imbatível em criar ideias e projetos. A Fernanda, que me ajudou a dar os primeiros passos no laboratório depois de muitos anos afastada, foi fundamental esse aprendizado. A Gabriela Macello que me acompanhou e ajudou nas análises no laboratório e me incentivou naqueles dias em que tudo dava errado, obrigada mesmo. A Talita Pimenta e a Nathália que realizaram as análises de espectrometria. E agradeço também a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram no laboratório.

As cervejarias que disponibilizaram as amostras de cerveja para a realização da pesquisa. Muito obrigada!

Agradeço a UNIRIO, ao PPGAN pela oportunidade, a CAPES pelo financiamento e a todos os professores do programa.

E por fim, agradeço a Deus por me proporcionar essa experiência de vida.

RESUMO

A cerveja é a bebida fermentada mais consumida no mundo e pode ser caracterizada de acordo com a fermentação; a cor; pelo teor alcoólico, pelo amargor; pela proporção de malte de cevada na composição dos ingredientes; e de outros tipos de maltes e cereais. Durante o armazenamento da cerveja na garrafa, reações de oxidação podem ocorrer, ocasionando mudanças sensoriais indesejáveis. No entanto, não se sabe ao certo o que acontece com a composição nutricional da bebida, especialmente aos compostos bioativos. No cenário recente, impulsionado pelo surgimento de pequenas cervejarias, há uma mudança nas técnicas de fabricação, que incorporam métodos de fermentação artesanais e a utilização de distintas variedades de maltes e lúpulos, obtendo cervejas com potencial para apresentar maior concentração e variedade de compostos bioativos. A proposta do presente trabalho foi caracterizar três estilos de cervejas artesanais (*Pilsen, Witbier e IPA*), produzidas em três micro-cervejarias do estado do Rio de Janeiro, através das análises de cor, amargor, teor de proteínas, carboidratos e compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, além de identificar os compostos fenólicos, por UPLC-MS^E, em três diferentes tempos, após o envase na garrafa. Com isso esperava-se melhor compreender as alterações na composição, ao longo do armazenamento. O estilo IPA apresentou maior alteração na cor ao longo do tempo, nos estilos Pilsen e IPA o amargor foi reduzido e, entre as marcas analisadas, os valores de IBU apresentaram diferenças significativas para cada estilo ($p < 0,05$). O teor de carboidratos diminuiu após três meses de armazenamento, mas o teor proteico permaneceu estável. O teor de fenólicos totais foi mais elevado para o estilo IPA, permaneceu estável para o estilo Pilsen e sofreu pequena redução no estilo Witbier. Os valores de compostos fenólicos totais foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) na comparação entre as marcas e para todos os estilos. Para todos os métodos de análises de capacidade antioxidante, o estilo IPA apresentou a maiores resultados e ensaio de ORAC apresentou os maiores valores (mmol trolox/L). Foram identificados, no total, 65 diferentes compostos fenólicos. O estilo IPA apresentou o maior número de compostos, entretanto a abundância total foi mais elevada no estilo Pilsen. Alguns compostos foram exclusivos para os estilos IPA e Witbier, possibilitando sua identificação e diferenciação. As grandes diferenças encontradas entre as marcas de cerveja analisadas, mostraram que os ingredientes, como os maltes e lúpulos, podem influenciar significativamente a composição e as características químicas da bebida, mesmo dentro de um mesmo estilo. Individualmente, cada composto fenólico identificado apresentou comportamentos distintos durante o armazenamento, alguns mantiveram-se estáveis, outros sofreram redução ou aumento. Mais estudos são necessários para melhor compreensão das transformações que ocorrem nestes compostos ao longo do armazenamento.

Palavras-chave: Compostos bioativos, Pilsen, IPA, Witbier, UPLC-MS^E, atividade antioxidante

ABSTRACT

EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN CRAFT BEERS AND STABILITY DURING STORAGE. Beer is the most consumed fermented beverage in the world and may be characterized according to fermentation; color; alcohol content; bitterness; proportion of barley malt in the composition of the ingredients; and presence of other kinds of malts and cereals. During the storage of beer in the bottle, oxidation reactions may occur, causing undesirable sensory changes. However, it is not known for certain what happens to the nutritional composition of the beverage, especially to the bioactive compounds. In the recent scenario, driven by the emergence of small breweries, there is a change in manufacturing techniques, which incorporate artisanal fermentation methods and the use of different varieties of malts and hops, obtaining beers with the potential to present a greater concentration and variety of bioactive compounds. The purpose of this study was to characterize three styles of craft beers (Pilsen, Witbier and IPA), produced in three micro-breweries in the state of Rio de Janeiro, through the analysis of color, bitterness, content of protein, carbohydrates and total phenolic compounds, and antioxidant capacity, in addition to identifying the phenolic compounds, by UPLC-MS^E, in three different times, after bottling. It was expected, therewith, to better understand the changes in composition, during storage. The IPA style showed a greater change in color over time, in the Pilsen and IPA styles the bitterness was reduced and, among the brands analyzed, the IBU values showed significant differences for each style ($p < 0.05$). The carbohydrate content decreased after three months of storage, but the protein content remained stable. The total phenolic content was higher for the IPA style, remained stable for the Pilsen style and suffered a small reduction in the Witbier style. The values of total phenolic compounds were significantly different ($p < 0.05$) when comparing brands and for all styles. For all methods of analysis of antioxidant capacity, the IPA style presented the highest results and the ORAC test presented the highest values (mmol trolox/L). In total, 65 different phenolic compounds were identified. The IPA style had the highest number of compounds; however, the total abundance was higher in the Pilsen style. Some compounds were exclusive to the IPA and Witbier styles, enabling their identification and differentiation. The great differences found between the beer brands analyzed, showed that the ingredients, such as malts and hops, can significantly influence the composition and chemical characteristics of the beverage, even within the same style. Individually, each phenolic compound identified showed different behaviors during storage, some remained stable, others suffered a reduction or increase. Further studies are needed to better understand the transformations that occur in these compounds during storage.

Keywords: Bioactive compounds, Pilsen, IPA, Witbier, UPLC-MS^E, antioxidant activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1: Processo de produção da cerveja indicando pontos onde há aumento (↑) ou redução (↓) no teor de compostos fenólicos.....	11
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1. Cores das amostras das três cervejarias com 3 meses de armazenamento e escala EBC.....	33
Figura 2. Histograma para os valores de amargor (IBU) de acordo com o estilo e o tempo de armazenamento das amostras de cerveja.....	34
Figura 3. Histograma para amargor (IBU) por estilo, das três cervejarias com 3 meses de armazenamento.....	35
Figura 4: Teor de fenólicos totais (mg GAL/L) de acordo com o estilo e o tempo de armazenamento das amostras de cerveja.....	39
Figura 5: Teor de fenólicos totais (mg GAL/L) por estilo, das amostras com 3 meses de armazenamento das diferentes cervejarias.....	40
Figura 6: Correlação de Pearson entre cor (EBC) e teor de compostos fenólicos totais (mg GAL/L) para o estilo IPA.....	43
Figura 7: Correlação entre atividade antioxidante (mmol Trolox/L) e teor de compostos fenólicos totais (mg GAL/L) para os estilos Pilsen, Witbier e IPA.....	43
Figura 8: Correlação entre atividade antioxidante (mmol Trolox/L) e amargor (IBU) para os estilos Pilsen, Witbier.....	44

CAPÍTULO III

Figura 1: Extração das amostras de cerveja em cartuchos Oasis [®] HLB.....	47
Figura 2: Abundância relativa total de compostos fenólicos durante o armazenamento nas cervejas de diferentes estilos.....	49
Figura 3: Quantitativo de compostos fenólicos identificados durante o armazenamento nas cervejas de diferentes estilos.....	50
Figura 4: Abundância relativa total de compostos fenólicos por estilos de duas marcas diferentes de cerveja.....	51
Figura 5: Quantitativo dos compostos fenólicos identificados, por estilos, de duas marcas diferentes de cerveja.....	51
Figura 6: Análises de componentes principais (PCA biplot) para todas as amostras de cerveja.....	56
Figura 7: Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo Pilsen.....	57

Figura 8. Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo Witbier.....	58
Figura 9. Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo IPA.....	59
Figura 10: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo Witbier e Pilsen.....	60
Figura 11: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo Pilsen e IPA.....	61
Figura 12: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo IPA e Witbier.....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau (mg GAL/L) de acordo com o tipo e estilo de cerveja.....	13
Tabela 2: Compostos fenólicos identificados em cervejas.....	15
Tabela 3: Conteúdo (mg/L) dos principais compostos fenólicos identificados e quantificados em cervejas do tipo <i>Lager</i> , <i>Ale</i> e sem álcool.....	16
Tabela 4: Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteau (mg GAL/L) em cervejas especiais e de acordo com o tipo.....	18
Tabela 5: Conteúdo de compostos fenólicos identificados (mg/L) em cervejas especiais.....	19
Tabela 6: Atividade Antioxidante da cerveja de acordo com tipo, estilo e método analítico.....	22

CAPÍTULO II

Tabela1: Características das amostras de cerveja.....	26
Tabela 2: Cores das amostras de cerveja durante o armazenamento pelos métodos EBC e CIE L*a*b*.....	31
Tabela 3: Cores das amostras das amostras das diferentes cervejarias com 3 meses de armazenamento.....	32
Tabela 4: Valores médios de IBU obtidos nas análises das amostras de cerveja e valores declarados pelos fabricantes no rótulo.....	36
Tabela 5: Teor de proteínas (g/L) e carboidratos (g/L) durante o armazenamento das amostras de cerveja por estilo.....	37
Tabela 6: Teor de proteínas (g/L) e carboidratos (g/L) das amostras das cervejarias com 3 meses de armazenamento por estilo.....	38
Tabela 7: Atividade antioxidante durante o armazenamento para cada estilo de cerveja.....	41
Tabela 8: Atividade antioxidante para cada estilo de cerveja das diferentes cervejarias.....	42

CAPÍTULO III

Tabela 1: Compostos fenólicos identificados exclusivamente nos estilos IPA e Witbier.....	50
Tabela 2: Compostos fenólicos identificados nas amostras de cerveja artesanal.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
BJCP	<i>Beer Judge Certification Program</i>
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
IBU	<i>International Bitterness Units</i>
IPA	<i>India Pale Ale</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OPLS-DA	Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PCA	Análise dos Componentes Principais
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 GERAL	6
2.2 ESPECÍFICOS.....	6
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
Cervejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante	7
1. Introdução.....	8
2. Metodologia	9
3. Processo produtivo e o teor de compostos fenólicos.....	9
3.1 Teor e variedade de compostos fenólicos na cerveja – influência do tipo, estilo, escala de produção e introdução de ingredientes alternativos.....	12
3.1.1 Teor de compostos fenólicos	12
3.1.2 Variedade de compostos fenólicos	13
4. Atividade Antioxidante nas cervejas.....	20
5. Considerações Finais.....	24
CAPÍTULO II – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CERVEJAS	25
1. Introdução.....	25
2. Metodologia.....	25
2.1 Coleta, identificação e preparo das amostras.....	25
2.2 Determinação da cor.....	27
2.3 Determinação do amargor	28
2.4 Determinação do teor de proteínas	28
2.5 Determinação do teor de carboidratos	28
2.6 Determinação do teor de fenólicos totais	29
2.7 Determinação da atividade antioxidante.....	29
2.7.1 DPPH.....	29
2.7.2 ABTS.....	29
2.7.3 FRAP	30
2.7.4 ORAC.....	30
2.8 Análises Estatísticas	30
3. Resultados e Discussão	31

3.1	Determinação da cor	31
3.2	Determinação do amargor	34
3.3	Determinação do teor de carboidratos e proteínas.....	36
3.4	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	39
3.5	Determinação da atividade antioxidante.....	41
3.6	Análises de correlação	43
4.	Considerações Finais.....	45
CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS		46
1.	Introdução	46
2.	Metodologia	46
2.1	Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS).....	46
3.	Resultados e Discussão	49
3.1	Compostos fenólicos identificados e abundância relativa	49
3.2	Análises multivariadas para identificação do perfil de fenólicos das amostras de cervejas	56
4.	Considerações Finais	62
CONCLUSÃO GERAL		63
ANEXOS.....		65
Referências Bibliográficas		68

1. INTRODUÇÃO

O surgimento da cerveja está intimamente ligado com a origem e desenvolvimento das civilizações. Acredita-se que a cerveja tenha sido descoberta acidentalmente, como resultado da fermentação ocasional de algum cereal, ligada ao surgimento de duas das mais antigas atividades humanas: a agricultura e a elaboração do pão. É provável que vários grupos pré-históricos tenham desenvolvido, independentemente, processos primitivos de obtenção de bebidas alcoólicas provenientes da fermentação de cereais. Portanto, sua criação e localização de origem não podem ser afirmadas definitivamente, tratando-se de um produto de origem anterior ao ano 6000 a.C. (Hornsey, 2003; Morado, 2017; Beer, 2018).

A cerveja é a bebida fermentada mais consumida no mundo e o Brasil é o terceiro maior produtor mundial (Sindicerv, 2021). O mercado brasileiro de cerveja segue em expansão e registrou, em 2019, uma produção de cerca de 14 bilhões de litros, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Cervejas (CERVBRASIL, 2020). Devido ao crescimento das cervejarias artesanais, o Brasil terminou o ano de 2019 com 1209 cervejarias registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo as marcas independentes as principais responsáveis por essa expansão (MAPA, 2020). Esses dados corroboram o estudo realizado com consumidores de cerveja, que mostrou o interesse por cervejas artesanais, devido ao modo de produção mais lento e pouco automatizado, aos ingredientes de melhor qualidade e à melhor percepção de sabores e aromas distintos (Carvalho et al., 2018).

A cerveja artesanal, também chamada de cerveja especial ou cerveja *premium*, normalmente é produzida em escalas menores (até 200.000 litros por mês), sendo o processo de produção lento, respeitando os tempos de fermentação e maturação. A adição de aditivos não é uma prática comum sendo priorizada a utilização, como principais ingredientes, apenas malte de cevada e lúpulo, com ênfase no sabor mais intenso e variado, oferecendo ao mercado diferentes estilos de cervejas (Oliver, 2011; Donadini et al., 2017, Marques et al., 2017).

Segundo a Instrução Normativa nº 65 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 2019, a cerveja pode ser caracterizada de acordo com a fermentação; a cor; pelo teor alcoólico; pela proporção de malte de cevada na composição dos ingredientes; composição de outros tipos de maltes e cereais (MAPA, 2019). A classificação em estilos considera os parâmetros de cor, amargor, teor alcoólico, a quantidade e os tipos de ingredientes como maltes e cereais, lúpulos, adição de adjuntos como frutas e especiarias, o tipo de fermentação que pode ser *Ale* ou *Lager* e também de acordo com o país de origem da receita (Morado, 2017).

A água representa cerca de 90% da composição da cerveja, o teor de sais como cálcio, bicarbonato, magnésio, sódio, sulfato e cloreto, deve ser controlado para não afetar as características sensoriais da cerveja e o pH deverá ficar na faixa de 5 a 5,5 para regulação da atividade enzimática durante o processo de produção (Briggs et al., 2004).

O malte é o produto resultante da germinação parcial e posterior dessecação e torrefação do grão da cevada (*Hordeum sativum*) ou de outros cereais pelo processo de maltagem. Pode ser chamado simplesmente de “malte”, quando apenas obtido da cevada, mas quando obtido de outro cereal, deve ser designado o tipo (malte de trigo, por exemplo.). Existem diversos tipos de maltes, que diferem no processo de sua obtenção, variando principalmente quanto à torrefação (maltes torrados) e a forma de secagem (maltes secos ou defumados). Nessa etapa ocorrem as reações de caramelização e a reação de Maillard; das quais derivam as características específicas de coloração e aroma da cerveja (Briggs et al., 2004; Brasil, 2009).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta herbácea e em sua flor estão presentes glândulas de lupulina que sintetizam resinas responsáveis pelo sabor amargo e os óleos essenciais que contribuem para os aromas da cerveja. As resinas são compostas pelos alfa-ácidos adhumulona, cohumulona e humulona e os beta-ácidos lupulona, adlupulona e colupulona; a concentração de cada um depende da variedade do lúpulo. Durante a ebulição do mosto, os alfa-ácidos, que apresentam alta solubilidade, são convertidos em iso-alfa-ácidos, que auxiliam na estabilidade da espuma e possuem efeito antimicrobiano. Os beta-ácidos são encontrados em quantidades menores devido a sua baixa solubilidade. Na composição do lúpulo já foram identificados diferentes compostos bioativos, como flavonoides, sendo o xanthohumol o mais abundante. Este composto é, porém, encontrado em baixas concentrações na cerveja, cerca de 4mg/L, devido a perdas durante o processo de produção, por adesão a proteínas insolúveis, que são retiradas na etapa de filtração e durante a fermentação (Caballero et al., 2012; Almaguer, et al., 2014; Karabin et al., 2015; Elrod, 2018).

As leveduras mais utilizadas para a fabricação da cerveja são as do gênero *Saccharomyces*, sendo a espécie *S. cerevisiae* a levedura mais comum para produzir cervejas do tipo *Ale*, produzidas pelo processo de alta fermentação (temperaturas de 15 a 25 °C). As espécies *S. pastorianus* e *S. calshbergensis* são utilizadas para as cervejas do tipo *Lager* obtidas por processo de baixa fermentação (temperaturas de 5 a 10 °C) (Tafulo et al., 2010; Beer, 2018).

Com relação à composição nutricional, na cerveja podem ser encontrados carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos, água e minerais como potássio, magnésio, cálcio, fósforo e um reduzido teor de sódio. São encontradas ainda vitaminas do complexo B (B1, B2, B3 e B12), que se originam do malte e das leveduras (Bamforth, 2002; Tafulo et al., 2010; Zhao et al.,

2012). Além disso, já foi relatada a presença de compostos bioativos, com possíveis efeitos benéficos para a saúde, como os compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos, que contribuem para diversas características sensoriais e antioxidantes (Callemien & Collin et al., 2009; Gaetano et al., 2016). Durante o armazenamento da cerveja na garrafa, reações de oxidação podem ocorrer, ocasionando mudanças sensoriais indesejáveis (Martínez et al, 2017). Não se sabe ao certo o que acontece com a composição nutricional da bebida, sobretudo com relação à composição dos compostos bioativos.

No cenário recente, impulsionado pelo surgimento de pequenas cervejarias, há uma mudança nas técnicas de fabricação que incorporam métodos de fermentação tradicionais e a utilização de grandes variedades de maltes e lúpulos. Consequentemente, cervejas que podem conter maior concentração de compostos bioativos são produzidas, o que está de acordo com a tendência mundial de produzir alimentos e bebidas que priorizem ou possuam efeitos benéficos à saúde dos consumidores (Machado et al., 2017). Dentro deste contexto, a proposta do trabalho foi a caracterização dos compostos fenólicos e atividades antioxidantes de três estilos de cervejas artesanais (*Pilsen, Witbier e IPA*), produzidas em microcervejarias, ou seja, em escalas de produção de até 200.000 litros por mês. Somou-se a isso, a análise em três tempos diferentes após o envase na garrafa, para compreensão das alterações que podem ocorrer em sua composição ao longo do armazenamento do produto.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a composição e a estabilidade dos compostos fenólicos presentes em cervejas artesanais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Coleta de informações sobre as etapas do processo de fabricação da cerveja em uma microcervejaria;
- Caracterização físico-química de três estilos de cervejas artesanais;
- Determinação da capacidade antioxidante das amostras;
- Avaliação dos compostos fenólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas;
- Verificação da estabilidade dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conteúdo desse capítulo encontra-se publicado em: Silva, R. N. P. da.; Dias, J. F.; Koblitz, M. G. B. Beers: relationship between styles; phenolic compounds and antioxidant capacity. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e42210313471, 2021

Cervejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante

RESUMO

Na composição química da cerveja são encontrados compostos fenólicos que contribuem para suas características sensoriais e possuem capacidade antioxidante, auxiliando a manutenção da estabilidade oxidativa. A compilação de 35 estudos, publicados entre 2006 e 2020, teve o objetivo de levantar informações a respeito dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante de cervejas e relacionar os resultados obtidos com os tipos de cervejas analisadas. Os resultados mostraram que, tanto o teor quanto o perfil de compostos fenólicos e a atividade antioxidante da cerveja, sofrem influência dos ingredientes utilizados e do processo de fabricação. As cervejas do tipo Ale, de coloração escura, com maior amargor e teor alcoólico, apresentaram valores mais elevados de compostos fenólicos e atividade antioxidante que outros tipos e estilos. As análises para as cervejas especiais mostraram que a adição de alimentos diversificados contribuiu para melhorar a composição em bioativos da bebida. Mais de 50 compostos fenólicos já foram identificados em cervejas, derivados dos ingredientes utilizados para a fabricação. Entre os compostos fenólicos mais frequentes estão os ácidos fenólicos, como os ácidos ferúlico e caféico e catequinas. Estudos observaram estreita correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante. E a presença de alguns compostos específicos pode aumentar esta atividade. No entanto, durante o armazenamento da cerveja, pode ocorrer redução da atividade antioxidante devido a mudanças nas estruturas das moléculas com essa capacidade. Estes estudos contribuem para o aprimoramento e desenvolvimento de bebidas com maior teor de compostos fenólicos, auxiliando sua estabilidade oxidativa e vida útil.

Palavras-chave: Fitoquímicos; Lager; Ale; Estabilidade.

ABSTRACT

In the chemical composition of beer, phenolic compounds that contribute to the sensory characteristics and show antioxidant capacity are found and help to maintain oxidative stability. The compilation of 35 studies, published between 2006 and 2020, aimed to gather information about the phenolic compounds and the antioxidant activity of beers and to relate the results obtained with the types of beers analyzed. The results showed that both, the content and the profile of phenolic compounds and the antioxidant activity of beer, are influenced by the ingredients used and by the manufacturing process. Ale beers, dark in color, with higher bitterness and alcohol content, showed higher values of phenolic compounds and antioxidant activity than other types and styles. Analyzes for specialty beers showed that the addition of diversified foods contributed to improving the bioactive composition of the beverage. Over 50 phenolic compounds have already been identified in beers, derived from the ingredients used in the manufacture. Among the most frequent phenolic compounds are phenolic acids, such as ferulic and caffeic acids and catechins. A close correlation between the content of total phenolic compounds and the antioxidant capacity was observed, and the presence of some specific

compounds may increase this activity. However, during beer storage, a decrease in antioxidant activity may occur due to changes in the structures of molecules related to this capacity. These studies contribute to the improvement and development of beverages with a higher content of phenolic compounds, improving their oxidative stability and shelf life.

Keywords: Phytochemicals; Lager; Ale; Stability.

1. Introdução

A cerveja é uma das bebidas mais antigas e consumidas do mundo (Martinez-Gomez et al., 2020). É obtida através da fermentação alcóolica do mosto cervejeiro, produzido geralmente com malte de cevada ou de trigo, água e lúpulo (Moura-Nunes et al., 2016). Na composição química da cerveja são encontrados água, carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais, etanol e, em menor proporção, compostos fenólicos, que contribuem com características sensoriais e possuem atividade antioxidante, auxiliando a manutenção da estabilidade oxidativa da bebida (Vanderhaegen et al., 2006; Callemien & Collin, 2009). Nos últimos anos os aspectos nutricionais das cervejas têm despertado interesse devido a sua composição em compostos fenólicos e seus possíveis benefícios para a saúde (Martinez-Gomez et al., 2020; Maia et al., 2020).

Cerca de 70 a 80% do teor de compostos fenólicos na cerveja são provenientes do malte e 20 a 30% dos lúpulos (Quifer-Rada et al., 2015) e outros ingredientes. Fatores genéticos e ambientais influenciam a composição química dessas matérias-primas (Bettenhausen et al., 2018). Os compostos fenólicos representam a principal classe de fitoquímicos nos cereais. São metabólitos secundários nas plantas produzidos como mecanismos de defesa contra pragas e patógenos e são essenciais para seu crescimento e reprodução (Santos et al., 2019).

Os compostos fenólicos são considerados multifuncionais por possuírem estrutura variável formada por anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos (Angelo & Jorge, 2007; Bezerra et al., 2020). A cerveja é rica em diferentes compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, flavonóis, flavonas, prenilflavonóides, como o xanthohumol, e taninos hidrolisáveis, como as proantocianidinas (Habschied et al., 2020). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos na cerveja influencia a qualidade sensorial da bebida, retardando as alterações de sabor e aroma durante o armazenamento na garrafa (Wannenmacher et al., 2019). Os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante irão variar nos diferentes estilos de cervejas devido aos tipos de maltes, cereais, lúpulos e processos de fabricação realizados. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi levantar informações disponíveis, nos últimos 15 anos, a respeito dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante de diferentes cervejas, procurando relacionar os resultados obtidos com os tipos de cervejas analisadas.

2. Metodologia

Foi realizada, neste estudo, uma revisão bibliográfica, segundo Pereira et al., (2018), sobre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante em cervejas de diferentes estilos, através de uma busca nas bases de dados Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>) e Wiley Online Library (<https://www.onlinelibrary.wiley.com/>) no período de 4 de janeiro a 25 de janeiro de 2021. Foram utilizadas as palavras-chave: “beer”, “phenolic compounds”, “antioxidant activities”, foi considerado para o período de publicação os últimos 15 anos. Como critérios de inclusão foram utilizados trabalhos que analisaram os teores de compostos fenólicos totais de cervejas de diferentes estilos e com ingredientes especiais, análise de atividade antioxidante em amostras de cervejas pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS ou ORAC, análise de identificação de compostos fenólicos em cervejas por espectrometria de massas. Não foram considerados trabalhos que realizaram análises em cervejas para testar novas técnicas e metodologias relacionadas a compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3. Processo produtivo e o teor de compostos fenólicos

A cevada passa pelo processo de maltagem para a produção do malte, que consiste na hidratação, germinação e secagem do grão. O processo de secagem é o responsável pelas diferentes características de cor e aromas dos maltes, derivadas da reação de Maillard e consequente liberação de melanoidinas e pirazinas (Martinez-Gomez et al., 2020; Zhao, 2015). O lúpulo é responsável pelo sabor amargo e por alguns aromas da cerveja. Trata-se de uma flor, da espécie *Humulus lupulus L.*, em cuja estrutura são encontradas as glândulas de lupulina, que produzem óleos essenciais ricos em compostos fenólicos (Almaguer et al., 2014; Elrod, 2018). Variados tipos de maltes e lúpulos são utilizados na produção da cerveja, que contribuem para as características de sabor e cor, originando os diferentes estilos como *Pilsen*, *Bock*, *IPA*, *Pale Ale*, *Weiss*, entre outros (Moura-Nunes et al., 2016).

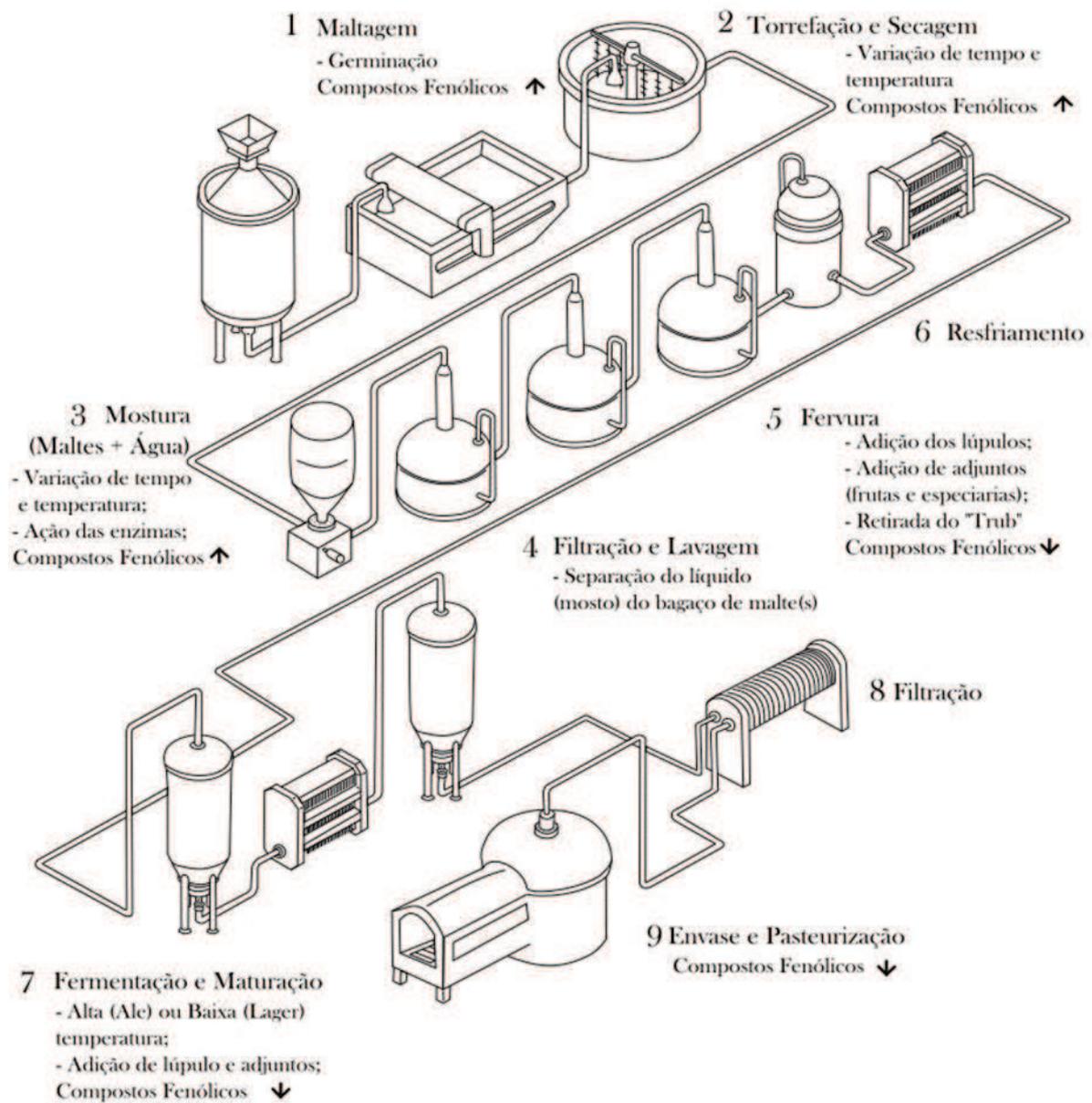
No processo de produção da cerveja ocorrem reações químicas que influenciam a composição de compostos fenólicos (Figura 1) (Wannenmacher et al., 2018; Zhao, 2015). Na etapa inicial ocorre a mistura dos maltes com a água produzindo o mosto, que será submetido a diferentes binômios de tempo:temperatura, favorecendo a ação das enzimas do malte, como as beta-glicanases e celulasas (40 a 45°C), as proteases (50 a 55°C) e as amilases (60 a 72°C). A composição de compostos fenólicos neste mosto é elevada, bem como a sua atividade antioxidante (Koren et al., 2019; Leitao et al., 2011; Martinez-Gomez et al., 2020).

Na próxima etapa ocorre a filtração do mosto, que consiste na separação do bagaço de malte da fração líquida, seguida da lavagem desse bagaço com água quente (78°C) para maior extração dos compostos. O mosto é aquecido até a fervura e são adicionados os lúpulos, ao final dessa etapa ocorre o whirlpool (redemoinho formado através da força centrípeta, que promove a concentração das partículas insolúveis em suspensão no centro do tanque) que leva a formação do *trub*, as partículas insolúveis de proteínas, compostos fenólicos e substâncias amargas. O *trub* é separado do mosto, pois pode provocar turbidez na bebida final, com isso o teor de compostos fenólicos é reduzido, pois grande parte fica concentrado no *trub* (Koren et al., 2019; Leitao et al., 2011; Martinez-Gomez et al., 2020; Wannemacher et al., 2018; Zhao, 2015).

O mosto é então resfriado e são adicionadas as leveduras para a etapa de fermentação, durante a qual supõem-se que ocorra a redução de compostos fenólicos como os taninos, que são consumidos pelas leveduras (Zhao, 2015). Na maturação, o mosto é mantido em temperaturas baixas para aprimorar aspectos sensoriais, em seguida é filtrado e são removidas células de leveduras e partículas insolúveis, que possuem compostos fenólicos em sua composição, provocando a redução do teor desses compostos (Martinez-Gomez et al., 2020; Zhao, 2015). Alguns autores também mencionam que, durante o armazenamento da cerveja na garrafa, ocorre redução no teor de compostos fenólicos do produto devido a processos oxidativos (Martinez-Gomez et al., 2020; Zhao, 2015).

Para a classificação das cervejas também é considerado o tipo de fermentação: as *Lagers* são produzidas por fermentação baixa, que geralmente é realizada entre 6 e 15°C com cepas de leveduras *Saccharomyces calshbergensis* (Oliveira Neto et al., 2017). Em contraste, as cervejas do tipo *Ale* são produzidas por fermentação alta, ocorrendo entre 16 e 24°C, com cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira Neto et al., 2017). E a cerveja *Lambic* é o resultado da fermentação espontânea (Martinez-Gomez et al., 2020; Oliveira Neto et al., 2017). Além disso, também podem ser adicionados, no preparo do mosto e no período de fermentação, vegetais, frutas, ervas ou flores que influenciarão a composição química da bebida final (Cho et al., 2018; Martínez et al., 2017).

Figura 1: Processo de produção da cerveja indicando pontos onde há aumento (↑) ou redução (↓) no teor de compostos fenólicos.



Fonte: Autores (2021)

3.1 Teor e variedade de compostos fenólicos na cerveja – influência do tipo, estilo, escala de produção e introdução de ingredientes alternativos

3.1.1 Teor de compostos fenólicos

Para quantificação do teor de compostos fenólicos totais de cerveja, o método usado na maioria dos trabalhos foi o de Folin-Ciocalteu, um método espectrofotométrico, com os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por litro (mg GAL/L) (Martinez-Gomez et al., 2020). De acordo com os estudos que analisaram cervejas do tipo Lager e Ale, o teor de compostos fenólicos totais variou significativamente com o tipo de cerveja (Tabela 1). De uma forma geral, as cervejas do tipo Ale, quando comparadas com as cervejas de coloração clara do tipo Lager, apresentaram teores de compostos fenólicos mais elevados (Marques et al., 2017; Habschied et al., 2020; Moura-Nunes et al., 2016; Piazzon et al., 2010). As cervejas do tipo Lager, como as dos estilos Pilsner e American Lager, apresentaram os menores teores de compostos fenólicos. Estes estilos são caracterizados por cervejas de coloração clara, produzidas com maltes pouco torrados (Marques et al., 2017; Granato et al., 2011; Habschied et al., 2020; Moura-Nunes et al., 2016; Piazzon et al., 2010; Rodrigues et al., 2011; Zhao et al., 2010, 2013). As cervejas do tipo Lager, que apresentaram teores de compostos fenólicos mais elevados foram dos estilos Dark e Bock, caracterizadas por sua coloração escura. Nestes estilos são usados maltes mais torrados nos quais o processo de maltagem e torrefação da cevada podem ser responsáveis por aumentar a liberação de compostos fenólicos (Habschied et al., 2020; Martinez-Gomez et al., 2020; Piazzon et al., 2010).

Bertuzzi et al., (2020) compararam os valores de fenólicos totais de cervejas produzidas em larga escala por grandes cervejarias e produzidas em pequena escala (produção de até 200.000 litros por mês) por microcervejarias, e os resultados demonstraram que o teor de fenólicos totais também pode ser influenciado pela escala de produção. A média de compostos fenólicos totais para cervejas de produção em larga escala foi de 403 mg GAL/L e para pequena escala 506 mg GAL/L. As cervejas artesanais produzidas em pequena escala, geralmente utilizam ingredientes diversificados que não são usados normalmente em grandes cervejarias.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau (mg GAL/L) de acordo com o tipo e estilo de cerveja

Estilos Lager	mg GAL/L	Estilos Ale	mg GAL/L	Referência
<i>Lager</i>	152 - 339	n.d	n.d	Zhao et al., 2010
<i>Lager, Pilsner, Bock</i>	452 - 875	<i>Wheat, Ale, Abbey</i>	504 - 622	Piazzon et al., 2010
<i>Lager</i>	120 - 200	<i>Brown Ale</i>	280 - 526	Granato et al., 2011
<i>Lager</i>	84 - 267	n.d	n.d	Zhao et al., 2012
<i>Standard American Lager</i>	164	<i>German weizen</i>	572	Moura-Nunes et al., 2016
<i>Classic American Pilsner</i>	448	<i>Irish Red Ale, American Pale Ale, Brown Poter</i>	475 - 531	Marques et al., 2017
<i>Standard American lager</i>	119 - 343	n.d	n.d	Rodrigues et al., 2020
<i>Lager, Pilsner, Dark</i>	464 - 776	<i>Black</i>	723 - 855	Habschied et al., 2020

n.d: Não determinado; mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

Fonte: Autores

3.1.2 Variedade de compostos fenólicos

Para a identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de cervejas, os métodos mais utilizados na literatura consultada envolveram o uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS), em virtude de sua alta sensibilidade (Cheiran et al., 2019). A Tabela 2 apresenta os compostos fenólicos identificados em estudos com cervejas de diferentes estilos e países. Os resultados dos trabalhos mostram que já foram identificados mais de 50 compostos fenólicos diferentes nas cervejas (Cheiran et al., 2019; Marques et al., 2017; Moura-Nunes et al., 2016; Pai et al., 2015; Piazzon et al., 2010; Quifer-Rada et al., 2015; Zhao et al., 2010).

De acordo com alguns trabalhos, que identificaram e quantificaram os compostos fenólicos (Tabela 3) nas amostras de cerveja, é possível observar que as cervejas do tipo *Lager* apresentaram maior abundância de ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 5-cafeoilquímico, ácido vanílico. As do tipo *Ale* apresentaram ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 5-cafeoilquímico, ácido cafeico. O ácido vanílico foi encontrado em maior abundância no tipo *Lager* e o ácido

cafeico no tipo Ale (Marques et al., 2017; Habschied et al., 2020; Moura-Nunes et al., 2016; Piazzon et al., 2010; Zhao et al., 2010). As cervejas sem álcool apresentaram valores baixos dos compostos fenólicos identificados, fator que pode ser relacionado a menor solubilidade na água, que reduz a sua extração no processo de produção da cerveja (Moura-Nunes et al., 2016). Os resultados compilados mostram, portanto, que os ingredientes e processos de fabricação podem influenciar significativamente tanto a variedade quanto o teor de compostos fenólicos nos diferentes tipos de cerveja (Zhao et al., 2010).

Tabela 2: Compostos fenólicos identificados em cervejas

Compostos fenólicos	Método analítico	Estilos	Referência
Ácido gálico, protocatecuico, (+)-catequina, vanílico, cafeico, siringico, (-)-epicatequina, p-cumárico e ferúlico	HPLC -DAD ¹	<i>Lager</i>	Zhao et al., 2010
Ácidos fenólicos, sinápico, vanílico, cafeico, p-cumárico, 4-hidroxifenilacético, ferúlico, siringico	HPLC -ECD ²	<i>Lager, Pilsner, Bock, Wheat, Ale, Abbey</i>	Piazzon et al., 2010
Ácido gálico, Tânico, p-cumárico, Cafeico, Vanílico, Catecol, Rutina, Quercetina	HPLC -MS ³	<i>Lager</i>	Pai et al., 2013
Ácido gálico, 4-vinilguaiacol, ácido cafeico-O-hexosídeo I, ácido cafeico-O-hexosídeo II, ácido protocatecuico-O-hexosídeo, ácido protocatecuico, catequina, catequina-O-hexosídeo I, ácido neoclorogênico 3-ácido cafeoilquinico, ácido hidroxifenilacético ácido I, catequina-O-dihexosídeo, ácido cumarico-O-hexosídeo, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido hidroxifenilacético II, epicatequina, ácido 1-cafeoilquinico, ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido 5-cafeoilquinico, catequina-O-hexosídeo II, Ácido cafeico, ácido feruloilquinico, ácido criptoclorogênico (ácido 4-cafeoilquinico), ácido hidroxifenilacético III, ácido p-cumárico, ácido sinápico-O-hexosídeo I, ácido ferúlico-O-hexosídeo, ácido indol-3-carboxílico, ácido sinápico -O-hexosídeo II, ácido ferúlico, apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo, apigenina-C-hexosídeo-C-pentosídeo, ácido sinápico, apigenina-C-hexosídeo, quercetina-3-O-glicosídeo, Kaempferol-3-O-glucosídeo, 3,7-Dimetilquercetina, Isoxanthumol, 8-Prenilnaringenina, 6-Prenilnaringenina, Cohumulona I, Ad-humulona, Coumulona II, n-Humulona, Iso-a-coumulone, Iso-a-ad / n-humulone, Iso-a-ad / n-humulone	LC-ESI-LQT-Orbitrap-MS ⁴	<i>Lager, Pilsen, Märzenbier e Sem álcool</i>	Quifer-Rada et al., 2015
Ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilacetico, 4-hidroxifenilacetico, 5-cafeoilquinico, benzóico, p-cumárico, ferúlico, gálico, siringico e vanílico	HPLC-UV-VIS-LC/MS ⁵	<i>Ale, Lager, American brown ale, American pale ale, Bock, Rauchbier, Schwarzbier, German weizen, Premium American lager, Standard American lager e Sem álcool</i>	Moura-Nunes et al., 2016
Ácido Gálico, p-cumárico, Cafeico, Ferúlico	HPLC -DAD ¹	<i>American Pale ale, Brown Poter, Classic American Pilsner, Irish Red ale</i>	Marques et al., 2017
Ácido 3,5-di-hidroxibenzoico; ácido gálico; ácido 3,4-di-hidroxibenzóico ácido 2,5-di-hidroxibenzóico; ácido 2,6-di-hidroxibenzóico; (Epi) hexosídeo de catequina I; ácido dimetoxibenzóico II; ácido 3-cafeoilquinico; (Epi) Galocatequina I; (Epi) Catequina hexosídeo II; (Epi) Catequina hexosídeo III; (Epi) Galocatequina II; Ácido hidroxibenzóico I; Proantocianidina B dímero I; Proantocianidina B dímero II; Ácido 5-cafeoilquinicina; Ácido hidroxibenzoico II; Proantocianidina B dímero III; Catequina; Taxifolina hexosídeo II; Quercetina hexosídeo rutinosídeo; Proantocianidina B dímero IV; Epicatequina; Ácido cafeico; Apigenina-C-glicosídeo-C-pentosídeo I; Proantocianidina B dímero V; Apigenina-C-hexosídeo-C-pentosídeo II; Apigenina -C-hexosídeo-O-hexosídeo; Ácido cinâmico; Derivado do ácido cinâmico; Quercetina-3-O-rutinosídeo; Apigenina-C-hexosídeo (vitexina ou isovitexina); Apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo II; Quercetina-3-O-glicosídeo Kaempferol-3-O-rutinosídeo; Ácido cumarico; Kaempferol-3-O-hexosídeo I; Kaempferol-3-O-hexosídeo II; Isofraxidina hexo lado II; Quercetina; Isoxanthumol; 8- Prenilnaringenina; Isohumulone; Xanthumol; Coumulona, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido dimetoxibenzóico, ácido 3-p-coumaroilquinico, ácido 4-p-coumaroilquinico, hexosídeo de taxifolina, quercetina dihexosídeo, ácido 3-feruloilquinico, ácido 4-feruloilquinico ácido feruloilquinico, apigenina-6,8-C-dipentosídeo e hexosídeo de isofraxidina	HPLC-DAD-ESI-MS/MS ⁶	<i>India Pale Ale, Wheat e Lager</i>	Cheiran et al., 2019

HPLC-DAD: Cromatografia líquida de alta resolução com detector de arranjo de diodos. 2- HPLC-ECD: Cromatografia líquida de alta resolução com detector eletroquímico. 3- HPLC-MS: Cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas. 4- LC-ESI-LQT-Orbitrap-MS: Cromatografia líquida de alta resolução com ionização por eletrospray acoplada ao espectrômetro de massas Orbitrap quadrupolo. 5- HPLC-UV-VIS-LC/MS: Cromatografia líquida de alta resolução com detector UV/visível acoplada ao espectrômetro de massas. 6-HPLC-DAD-ESI-MS/MS: Cromatografia líquida de alta resolução com detector de matriz diodo com ionização por eletrospray acoplada ao espectrômetro de massas.

Fonte: Autores

Tabela 3: Conteúdo (mg/L) dos principais compostos fenólicos identificados e quantificados em cervejas do tipo *Lager*, *Ale* e sem álcool

Compostos fenólicos (mg/L)	<i>Lager</i>	<i>Ale</i>	Sem álcool	Referência
Ácido gálico	0,33 - 14,67	5,90 - 14,22	0,51 - 5,17	Moura-Nunes et al., 2016, Marques et al., 2017, Habschied et al., 2020
Ácido ferúlico	0,0 - 17,5	0,13 - 17,5	0,0 - 6,38	Zhao et al., 2010, Piazzon et al., 2010, Moura-Nunes et al., 2016, Marques et al., 2017
Ácido cafeico	0,08 - 3,95	0,98 - 9,05	0,77	Zhao et al., 2010, Piazzon et al., 2010, Marques et al., 2017, Habschied et al., 2020
Ácido vanílico	0,0 - 7,17	0,0 - 2,91	0,0 - 0,78	Zhao et al., 2010, Piazzon et al., 2010, Moura-Nunes et al., 2016
Ácido p-cumárico	0,0 - 2,23	0,12 - 5,58	0,0 - 0,72	Zhao et al., 2010, Piazzon et al., 2010, Moura-Nunes et al., 2016, Marques et al., 2017, Habschied et al., 2020
Ácido siríngico	0,06 - 0,99	0,09 - 1,23	0,0 - 0,77	Zhao et al., 2010, Piazzon et al., 2010, Moura-Nunes et al., 2016
Ácido sinápico	2,62 - 3,53	2,35 - 4,18	1,58	Piazzon et al., 2010
Ácido benzóico	0,0 - 0,58	0,0 - 0,55	0,0 - 0,22	Moura-Nunes et al., 2016
Ácido 3,4-dihidroibenzoico	0,10 - 5,59	0,21 - 1,10	0,42 - 2,08	Moura-Nunes et al., 2016
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	0,14 - 2,99	0,24 - 1,80	0,0 - 5,77	Moura-Nunes et al., 2016
Ácido 4-hidroxifenilacético	0,0 - 2,82	0,0 - 1,46	0,0 - 1,97	Piazzon et al., 2010, Moura-Nunes et al., 2016
Ácido 5-cafeoilquínico	0,09 - 10,96	0,23 - 6,53	0,15 - 0,5	Moura-Nunes et al., 2016
Ácido protocatecuico	0,0 - 1,3	n.d	n.d	Zhao et al., 2010
Catequina	0,03 - 4,00	n.d	n.d	Zhao et al., 2010
Epicatequina	0,0 - 3,44	3,67 - 4,55	n.d	Zhao et al., 2010, Habschied et al., 2020

n.d: Não determinado

Fonte: Autores

Cheiran et al., (2019) realizaram uma análise exploratória e verificaram que a identificação de alguns compostos fenólicos permite diferenciar estilos de cervejas como IPA, Lager e Weiss. A cerveja do estilo IPA apresentou maior número de compostos fenólicos. Os ácidos cafeoilquínico e cumaroilquínico, ácido p- cumárico, ácido kaempferol-3-O-rutinosídeo e proantocianidina B dímeros III e V foram detectados em praticamente todas as amostras de IPA, em apenas algumas amostras de Lager e não foram encontrados na maioria das amostras de Weiss, permitindo a diferenciação.

Cervejas especiais produzidas com adição de frutas, especiarias ou algum alimento tem se tornado tendência para atender aos mais variados consumidores (Mesquita et al., 2020; Nardini & Foddai, 2020). Estes ingredientes são adicionados na etapa de fermentação da cerveja ou durante o processo de preparo do mosto, onde ocorre a extração dos compostos fenólicos destes ingredientes, o que contribui para o aumento do teor e da variedade de compostos, assim como da atividade antioxidante (Nardini & Foddai, 2020).

Estudos avaliaram a adição de extratos de hibisco (*Hibiscus sabdariffa L*), cereja, framboesa, pêssego, damasco, uvas, ameixa, laranja, maçã, caqui, nozes, castanhas, cacau, mel, chá verde, café, alcaçuz, Goji berry (*Lycium barbarum*) - um fruto usado tradicionalmente na medicina chinesa, conhecido pelos seus efeitos terapêuticos - e batata doce. Todas as cervejas especiais apresentaram teores de compostos fenólicos mais elevados, quando comparadas com amostras de cervejas convencionais (Tabela 4) (Cho et al., 2018; Ducruet et al., 2017; Humia et al., 2020; Martínez et al., 2017; Nardini & Foddai, 2020; Nardini & Garaguso, 2020).

A identificação de compostos fenólicos nas cervejas especiais apresentou elevada variação no perfil de compostos e nos valores de abundância. Além disso, a etapa de adição destes alimentos no processo de produção, pode influenciar a composição da bebida final (Tabela 5) (Ducruet et al., 2017; Nardini & Foddai, 2020; Nardini & Garaguso, 2020).

A cerveja adicionada de goji berry na etapa de mostura, apresentou elevados teores de rutina (22,44 mg/L) e teores mais baixos de ácido ferúlico (4,56 mg/L) e p-cumárico (3,86 mg/L), porém ao ser adicionada somente na etapa de fermentação a presença de rutina não foi detectada e os teores de ácido ferúlico (7,58 mg/L) e p-cumárico (7,81 mg/L) foram mais elevados, fato que pode estar relacionado a temperaturas mais baixas nesta etapa do processo (Ducruet et al., 2017).

Tabela 4: Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteau (mg GAL/L) em cervejas especiais e de acordo com o tipo.

Cervejas Especiais	Lager (mg GAL/L)	Ale (mg GAL/L)	Lambic (mg GAL/L)	Referência
Hibisco	n.d	Hibisco: 743 Convencional: 294	n.d	Martínez et al., 2017
Goji berry	n.d	Goji berry: 623 Convencional: 355	n.d	Ducruet et al., 2017
Caqui	n.d	Caqui: 714 Convencional: 507	n.d	Cho et al., 2018
Cereja, framboesa, pêssego, damasco, uvas, ameixa, laranja e maçã	Convencional: 321	Especiais: Cereja 767, Laranja 639, Uvas 631, Ameixa 598, Pêssego 510, Framboesa 465, Damasco 454, Maçã 399. Convencional: 383 a 482	Framboesa 536 Convencional: 403	Nardini e Garaguso 2020
Nozes, castanhas, cacau, mel, chá verde, café ou alcaçuz.	Castanhas: 883 Convencional: 273 a 320	Especiais: Cacau 1026, Nozes 964, Alcaçuz 819, Café 582, Mel 538, Chá verde 464. Convencional: 382 a 446	n.d	Nardini e Foddai 2020
Batata doce	n.d	Batata doce: 230 Convencional: 210	n.d	Humia et al., 2020

n.d: Não determinado; mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

Fonte: Autores

A cerveja adicionada de castanhas durante a fermentação, apresentou elevada concentração de ácido ferúlico (27,55 mg/L) e o ácido clorogênico foi identificado somente na cerveja adicionada de café. Em todas as cervejas adicionadas de nozes, castanhas, cacau, mel, chá verde, café, alcaçuz, cereja, framboesa, pêssego, damasco, uvas ou maçã, foram identificados catequina, epicatequina, rutina, miricetina, quercetina e resveratrol, compostos não identificados nas cervejas convencionais analisadas. As cervejas com ameixa e cereja apresentaram elevada concentração de ácido cafeico (89,80 e 54,60 mg/L respectivamente) e a cerveja com ameixa também foi abundante em ácido neoclorogênico (60,30 mg/L). Ao comparar as cervejas especiais e as convencionais é possível observar que para todos os

compostos fenólicos identificados a concentração aumentou com a adição dos diferentes alimentos (Nardini & Foddai, 2020; Nardini & Garaguso, 2020).

Tabela 5: Conteúdo de compostos fenólicos identificados (mg/L) em cervejas especiais

Compostos fenólicos (mg/L)	<i>Lager</i>	<i>Ale</i>	<i>Lambic</i>
Ácido ferúlico	Especial: 27,55 Convencionais: 11,00 - 14,21	Especiais: 8,22 - 27,87 Convencionais: 1,10 - 22,60	Especial: 13,10 Convencionais: 16,63
Ácido cafeico	Especial: 3,47 Convencionais: 1,61 - 1,86	Especiais: 1,48 - 89,80 Convencionais: 2,98 - 6,38	Especial: 2,77 Convencionais: 4,98
Ácido vanílico	Especial: 5,09 Convencionais: 1,93 - 4,46	Especiais: 2,03 - 6,98 Convencionais: 2,73 - 5,45	Especial: 5,06 Convencionais: 1,47
Ácido p-cumárico	Convencionais: 0,77 - 1,56	Especiais: 1,27 - 62,40 Convencionais: 0,38 - 3,10	Especial: 1,25 Convencionais: 1,33
Ácido siríngico	Especial: 1,24 Convencionais: 0,0 - 0,49	Especiais: traços - 1,42 Convencionais: 0,51 - 0,74	Especial: 1,23 Convencionais: 0,89
Ácido sinápico	Convencionais: 2,66 - 4,53	Especiais: 0,33 - 22,20 Convencionais: 2,19 - 4,80	Especial: 3,10 Convencionais: 4,87
Ácido clorogênico	Especial: 0,0 Convencionais: 0,0	Especiais: 0,0 - 12,71 Convencionais: 2,19 - 4,80	Especial: 0,84 Convencionais: traços
Ácido neoclorogênico	Especial: 0,0 Convencionais: 0,0	Especial: 0,0 - 60,30 Convencionais: 0,0	Especial: 2,59 Convencionais: 0,0
Catequina	Especial: 4,65 Convencionais: 0,0	Especiais: traços - 20,24 Convencionais: 0,0	Especial: 6,03 Convencionais: 0,0
Epicatequina	Especial: 3,68 Convencionais: 0,0	Especiais: traços - 3,09 Convencionais: 0,0	Especial: 0,0 Convencionais: 0,0
Miricetina	Especial: traços Convencionais: 0,0	Especiais: traços - 8,82 Convencionais: 0,0	Especial: 1,54 Convencionais: 0,0
Quercetina	Especial: traços Convencionais: 0,0	Especiais: 0,30 - 7,10 Convencionais: 0,0	Especial: 3,07 Convencionais: 0,0
Rutina	Especial: 0,0 Convencionais: 0,0	Especiais: 0,0 - 22,44 Convencionais: 0,0	Especial: 0,0 Convencionais: 0,0
Resveratrol	Especial: 0,35 Convencionais: 0,0	Especiais: 0,0 - 2,24 Convencionais: 0,0	Especial: 0,14 Convencionais: 0,0

Baseado em dados de Ducruet et al., 2017, Nardini e Garaguso 2020 e Nardini e Foddai 2020

Fonte: Autores

4. Atividade Antioxidante nas cervejas

A atividade antioxidante nas cervejas, está relacionada à presença de compostos fenólicos provenientes, naturalmente, dos maltes e lúpulos. Estes compostos possuem a capacidade de retardar e/ou prevenir as reações de oxidação durante o processo de produção determinando a vida útil da cerveja, além de influenciarem o sabor (Rahman et al., 2020).

Vários métodos podem ser usados para avaliação da atividade antioxidante, os ensaios comumente usados, por serem simples, rápidos e com boa sensibilidade são: DPPH, FRAP, ABTS e ORAC (Martínez et al., 2017; Tafulo et al., 2010). Em cada método ocorrem diferentes reações químicas que sofrem influência de fatores como estrutura química dos compostos antioxidantes, pH, temperatura e tipos de solventes, por isso para um resultado mais preciso é importante a realização de mais de um método para a mesma amostra (Martínez et al., 2017; Tafulo et al., 2010). O método DPPH é baseado na captura do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), que provoca redução da absorbância devido a uma reação de oxirredução. É um ensaio de transferência de elétron, onde a substância antioxidante doa um hidrogênio e reduz a solução de DPPH (Pires et al., 2017). O ensaio de FRAP, consiste na determinação do poder de redução do íon ferrico, com produção do íon Fe^{2+} a partir da redução do íon Fe^{3+} , pela transferência de elétrons (Urrea-Victoria et al., 2016). No método do ABTS [(2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] a absorção do radical catiônico $ABTS^{*+}$ é comparada com a absorção após a estabilização do $ABTS^{*+}$ por antioxidantes, indicada pela mudança de coloração da solução (Torres et al., 2017). O ensaio de ORAC determina a capacidade de absorção de radicais de oxigênio e avalia a diminuição da emissão da fluorescência. O radical AAPH (2,20-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorídrico) reage com o oxigênio e origina um radical peroxil estável que oxida a fluoresceína (Tafulo et al., 2010).

As cervejas do tipo Ale e/ou as de coloração escura como as do estilo Bock, Abbey, Brown Ale, Dark, Rauchbier e Black, geralmente, são as que apresentam maior atividade antioxidante, bem como as cervejas especiais, que são adicionadas de diferentes alimentos (Tabela 6) (Cho et al., 2018; Granato et al., 2011; Leitao et al., 2011; Moura-Nunes et al., 2016; Nardini & Foddai, 2020; Nardini & Garaguso, 2020; Piazzon et al., 2010; Rahman et al., 2020; Tafulo et al., 2010). Piazzon et al (2010), verificaram que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante aumentaram, de acordo com os estilos, na seguinte ordem: cerveja sem álcool < Lager < Pilsner < Wheat < Ale < Abbey < Bock. E os compostos, ácidos síringico, sinápico, cafeico e ferúlico apresentaram forte correlação com o ensaio de FRAP, podendo ser considerados os principais contribuintes para os valores de atividade antioxidante.

Diversos estudos observaram grande correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da cerveja. Além disso, a presença de compostos específicos pode influenciar a atividade antioxidante, promovendo seu aumento (Piazzon et al., 2010; Rahman et al., 2020; Tafulo et al., 2010; Zhao et al., 2010). Rahman et al (2020), observou que o 4-vinilguaiacol, composto derivado do ácido ferúlico, pode contribuir para aumentar a atividade antioxidante da bebida, devido a sua elevada correlação com os ensaios de ABTS e FRAP realizados.

O amargor e o teor alcóolico também apresentaram elevada correlação com o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Cervejas mais amargas possuem maior quantidade de lúpulo, ingrediente rico em compostos fenólicos. O maior teor alcóolico, por sua vez, propicia maior solubilidade dos compostos fenólicos (Moura-Nunes et al., 2016).

Tabela 6: Atividade Antioxidante da cerveja de acordo com tipo, estilo e método analítico

Método Analítico	DPPH			ABTS			FRAP			ORAC			Referência	
	Estilos de Cerveja	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale		Sem álcool
Lager (mmol Trolox/L)	0,24 -1,35	n.d	n.d	0,55 – 1,95	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Zhao et al., 2010
Sem álcool, Lager, Black, Stout, Pilsner, Dark Strong Ale, Tripel, Abbey, Blond Ale, Belgium Strong Ale (mmol Trolox/L)	0,72 – 1,64	1,00 – 2,05	0,61 – 1,98	0,57 – 1,02	0,64 – 1,18	0,63 – 0,83	0,17 – 0,46	0,35 – 0,55	0,12 – 0,34	3,69 – 14,79	10,64 – 29,10	7,01 – 10,70	Tafulo et al., 2010	
Sem álcool, Pilsner, Lager, Wheat, Ale, Abbey, Bock (mmol Fe+2/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2,17 – 4,66	2,40 – 3,55	1,52	n.d	n.d	n.d	Piazzon et al., 2010	
Brown Ale, Lager (mmol Trolox/L)	4,7% - 32,2% de redução	14% - 59,9% de redução	n.d	0,42 – 7,72	0,76 – 10,51	n.d	Granato et al., 2011							
Lager (mmol Trolox/L)	0,24 – 0,97	n.d	n.d	0,16 – 9,12	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Zhao et al., 2012	
Sem álcool, Rauchbier, Standard American lager (mmol Trolox/L e FRAP mmol Fe+2/L)	n.d	n.d	n.d	0,40 – 3,02	n.d	n.d	6,37	n.d	0,81	n.d	n.d	n.d	Moura-Nunes et al., 2016	
Lager (mmol Trolox/L)	0,67 – 0,93	n.d	n.d	1,57 – 2,04	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,54 – 8,45	n.d	n.d	Li et al., 2016	
Lager, Stout, Dark (mmol Trolox/L)	n.d	0,2 – 0,71	n.d	0,40	1,99	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Rahman et al., 2020	

Método Analítico	DPPH			ABTS			FRAP			ORAC			Referência
	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale	Sem álcool	Lager	Ale	Sem álcool	
Cervejas Especiais													
Goji berry (mmol Trolox/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	Goji berry: 3,82 Convencional: 2,26	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Goji berry: 16,84 Convencional: 8,87	n.d	Ducruet et al., 2017
Caqui (percentual de inibição de radicais)	n.d	Caqui: 91% Convencional: 80%	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Cho et al., 2018
Hibisco (mmol Trolox/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	Hibisco: 9,28 Convencional: 5,71	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	Martínez et al., 2017
Cereja, framboesa, pêssego, damasco, uvas, ameixa, laranja e maçã (mmol Trolox/L e FRAP mmol Fe+2/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	Especial: 1,62 – 3,53 Convencional: 1,29 – 2,03	n.d	n.d	Especial: 3,08 – 9,76 Convencional: 3,31 – 4,39	n.d	n.d	n.d	n.d	Nardini e Garaguso 2020
Nozes, castanhas, cacau, mel, chá verde, café ou alcaçuz. (mmol Trolox/L e FRAP mmol Fe+2/L)	n.d	n.d	n.d	Castanhas: 6,2 Convencional: 1,7 – 2,8	Especial: 2,5 – 5,2 Convencional: 1,5 – 2,6	n.d	Castanhas: 3,4 Convencional: 1,5 – 1,8	Especial: 3,6- 10,2 Convencional: 3,4 – 3,9	n.d	n.d	n.d	n.d	Nardini e Foddai 2020

n.d: Não determinado

Fonte: Autores

Durante o armazenamento da cerveja, pode ocorrer redução da atividade antioxidante devido a mudanças nas estruturas das moléculas antioxidantes como os compostos fenólicos e as melanoidinas. Como consequência são formados compostos responsáveis pelas alterações de aroma e sabor da bebida, como o 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, furfural, 2-acetil-furano, benzaldeído, fenilacetaldeído, dietil succinato, etil nicotinato e γ -nonalactona. No estudo de Li et al., (2016), o teor destes compostos aumentou em cervejas analisadas durante seis meses de armazenamento com concomitante redução da sua atividade antioxidante. Mais estudos são necessários para avaliação da estabilidade da cerveja durante o armazenamento, pois podem fornecer informações que contribuem para o desenvolvimento de melhorias na qualidade da bebida.

5. Considerações Finais

A compilação dos 35 estudos, publicados entre de 2006 e 2020, sobre os fitoquímicos e a atividade antioxidante de cervejas demonstrou que tanto o teor quanto o perfil de compostos fenólicos assim como a atividade antioxidante da cerveja sofrem influência dos ingredientes utilizados e do processo de fabricação. Dessa forma, cervejas do tipo Ale, de coloração escura, com maior amargor e teor alcóolico, apresentaram valores mais elevados de compostos fenólicos e atividade antioxidante que outros tipos e estilos da bebida. Os resultados das análises para as cervejas especiais mostraram que a adição de alimentos diversificados contribuiu para melhorar a composição em bioativos da bebida final.

Verifica-se, portanto, que o estudo da composição de fitoquímicos da cerveja contribui para o aprimoramento e desenvolvimento de bebidas com maior teor de compostos fenólicos, auxiliando sua estabilidade oxidativa e vida útil e favorecendo sua composição nutricional.

CAPÍTULO II – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CERVEJAS

1. Introdução

A caracterização físico-química da cerveja permite a classificação em estilos que determinam, principalmente, o perfil sensorial da bebida. De acordo com as diretrizes de estilos de cerveja criadas pelo *Beer Judge Certification Program* (BJCP), as cervejas do estilo Pilsen apresentam coloração clara, brilhante e cristalina, amargor leve a médio (8 a 30 IBU) e teor alcoólico de 4 a 5,5% v/v, produzida com malte de cevada claro e com fermentação do tipo Lager. O estilo Witbier apresenta coloração amarelo dourado com aparência turva, amargor leve (8 a 20 IBU) e teor alcoólico de 4,5 a 5,5% v/v, produzida com malte de trigo, malte de cevada, pode conter aveia, condimentos como coentro, pimenta rosa, casca de laranja ou limão e a fermentação é do tipo Ale. O estilo IPA (India Pale Ale) apresenta coloração de dourado médio a âmbar-avermelhado, elevado amargor (40 a 70 IBU), e teor alcoólico de 5,5 a 7,5% v/v, pode ser produzida com maltes de cevada claros ou mais escuros e a fermentação é do tipo Ale.

A cerveja é uma mistura de moléculas químicas que podem interagir entre si durante o processo de produção e armazenamento, influenciando a composição nutricional e os aspectos sensoriais da bebida final (Caballero et al., 2012). Este capítulo tem como objetivo caracterizar as amostras de cervejas dos estilos Pilsen, Witbier e IPA através das análises de cor, amargor, teor de proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e atividade antioxidante. E verificar as possíveis alterações químicas destas características, durante o armazenamento da bebida na garrafa por seis meses além de comparar os resultados entre marcas produzidas em diferentes cervejarias.

2. Metodologia

2.1 Coleta, identificação e preparo das amostras

Foram coletadas 15 amostras de cervejas artesanais, em garrafas de 500 mL ou 600 mL, em três cervejarias, localizadas nas cidades do Rio de Janeiro, Niterói e Petrópolis, no estado do Rio de Janeiro. Todas as amostras foram armazenadas no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) em temperatura ambiente.

Foram analisadas cervejas dos estilos Pilsen, Witbier e IPA, sendo que as amostras (total de 9) coletadas na cervejaria da cidade do Rio de Janeiro, foram analisadas em três tempos ao longo do armazenamento: logo após a fabricação, três meses e seis meses após a produção, para cada estilo. As amostras das cervejarias de Niterói e Petrópolis (total de 6) foram analisadas no tempo de três meses após a produção. Todas as amostras foram coletadas em triplicata. Na Tabela 1 estão apresentadas as características das amostras.

Tabela1. Características das amostras de cerveja

Amostras	Ingredientes	Tipo de Fermentação	Tempo de armazenamento	Teor alcoólico* (%v/v)
Pilsen 0 (P0)	Água, malte de cevada, lúpulo e leveduras	<i>Lager</i>	0 meses	4,8
Pilsen 3 (P3)	Água, malte de cevada, lúpulo e leveduras	<i>Lager</i>	3 meses	4,8
Pilsen N (PN)	Água, malte de cevada, lúpulo e leveduras	<i>Lager</i>	3 meses	4,5
Pilsen B (PB)	Água, malte de cevada, lúpulo e leveduras	<i>Lager</i>	3 meses	4,5
Pilsen 6 (P6)	Água, malte de cevada, lúpulo e leveduras	<i>Lager</i>	6 meses	4,8
Witbier 0 (W0)	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, levedura, limão siciliano, coentro, pimenta rosa, aveia	<i>Ale</i>	0 meses	4,5
Witbier 3 (W3)	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, levedura, limão siciliano, coentro, pimenta rosa, aveia	<i>Ale</i>	3 meses	4,5
Witbier N (WN)	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, levedura, limão siciliano, coentro	<i>Ale</i>	3 meses	4,5
Witbier B (WB)	Água, malte de cevada, malte de trigo, trigo em flocos, lúpulo, levedura, casca de laranja, coentro, aveia	<i>Ale</i>	3 meses	5,2
Witbier 6 (W6)	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, levedura, limão siciliano, coentro, pimenta rosa, aveia	<i>Ale</i>	6 meses	4,5
IPA 0 (I0)	Água, malte de cevada, lúpulo, levedura	<i>Ale</i>	0 meses	7,0
IPA 3 (I3)	Água, malte de cevada, lúpulo, levedura	<i>Ale</i>	3 meses	7,0
IPA N (IN)	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, levedura	<i>Ale</i>	3 meses	6,4
IPA B (IB)	Água, malte de cevada, lúpulo, levedura	<i>Ale</i>	3 meses	5,2
IPA 6 (I6)	Água, malte de cevada, lúpulo, levedura	<i>Ale</i>	6 meses	7,0

* Ingredientes e valores de teor alcoólico informados no rótulo das amostras

As amostras analisadas nos tempos de três e seis meses eram do mesmo lote de produção e as analisadas no tempo zero para os três estilos eram de lotes diferentes.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com Cheiran et al., (2019) com modificações. O conteúdo de 3 garrafas de 500 mL ou 600 mL do mesmo estilo e tempo de armazenamento foram homogeneizados por 10 segundos, em um becker de 2 L, seguido de degaseificação em ultrassom de ponta (Desruptor 500 W, Eco-sonics, Brasil), por 7 minutos, em potência máxima (99%), em banho de gelo, seguida de filtração em filtro de papel. As amostras assim preparadas foram aliqüotadas e congeladas. O armazenamento foi realizado em ultra freezer a -80°C até as análises.

2.2 Determinação da cor

Para a análise de cor pelo método EBC (2000) (European Brewery Convention), foi realizada a centrifugação (Centrifuga Multifuge XR3, Datamed, Thermo Scientific) das amostras em tubos Falcon de 15 mL, por 5 minutos a 10.000 rpm, seguida da coleta do sobrenadante para leitura em espectrofotômetro (UV -2700, Shimadzu) a 430 nm. O resultado foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Método EBC} = 25 \times \text{Abs } 430 \text{ nm [1]}$$

Cervejas claras apresentam valor de EBC até 20 e cervejas escuras acima de 20 EBC.

A análise de cor também foi realizada pelo método colorimétrico CIE $L^* a^* b^*$. As amostras foram centrifugadas (Centrifuga Multifuge XR3, Datamed, Thermo Scientific) por 5 minutos a 10.000 rpm. Os parâmetros com coordenadas L^* (luminosidade), $+a^*$ (vermelho), $-a^*$ (verde), $+b^*$ (amarelo) e $-b^*$ (azul) das amostras foram determinados em triplicata em um colorímetro (CM-5, Konica Minolta) por meio das medições de transmitância em uma cubeta de vidro (10 mm). Os parâmetros da medida colorimétrica foram iluminação difusa: 0° visualização e fonte de luz D65. Placas escuras e brancas foram usadas como padrões para calibrar (0% e 100%, respectivamente) as medições de cores.

2.3 Determinação do amargor

A análise de amargor foi realizada pelo método EBC (2004), com modificações. Em um tubo tipo Falcon de 15 mL foi adicionado 2,5 mL da amostra, acidificada com 125 µL de HCL 6M, e em seguida, 5 mL de iso-octano. A amostra foi homogeneizada no shaker (Incubadora Shaker Novatécnica) por 10 minutos a 240 rpm, em seguida centrifugada (Centrífuga Multifuge XR3, Datamed, Thermo Scientific) a 3.000 rpm por 3 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro (UV -2700, Shimadzu) a 275 nm com iso-octano como branco. O resultado foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{IBU (International Bitterness Units)} = 50 \times \text{Abs } 275 \text{ nm [2]}$$

2.4 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi realizado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) com adaptações. Inicialmente foi preparada uma solução mãe com 20 mg de BSA (Albumina de Soro Bovino) dissolvida em água MilliQ em balão de 10 mL, em seguida foi preparada a curva padrão com diluições seriadas em concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL. Em 20 µL de amostra foi adicionada 1 mL da solução de Bradford e realizado descanso por 10 minutos, em seguida as amostras foram transferidas em triplicata para microplaca e foi realizada a leitura a 595 nm em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices). Os valores de teores de proteínas foram expressos em g/L de cerveja.

2.5 Determinação do teor de carboidratos

O teor de açúcares totais foi realizado pelo método fenol-sulfúrico de acordo com Masuko et al. (2005) com adaptações. As amostras foram diluídas 1:1000, em seguida foi preparada a curva padrão de glicose com concentrações de 2 a 20 µg/100 µL. Em tubos de ensaio foram adicionadas as amostras em triplicata, o ácido sulfúrico e o fenol (5%), os tubos foram aquecidos em banho-maria a 90°C por 10 minutos, transferidos para a microplaca e a leitura realizada em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices) a 490 nm. Os valores de teores de açúcares foram expressos em g de glicose por litro de cerveja (g/L).

2.6 Determinação do teor de fenólicos totais

Determinação do teor de compostos de fenólicos totais com o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) e modificado por Georgé, Brat, Alter e Amiot (2005). A quantificação dos compostos foi realizada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico, sendo os valores expressos em mg equivalentes de ácido gálico/mL de amostra. As amostras foram diluídas 1:20, em seguida foi preparada a curva padrão de ácido gálico com concentrações de 5 a 130 µg/mL. As amostras e pontos da curva foram adicionados, em triplicatas, em tubos de ensaio, seguido do carbonato de sódio 20% e o reagente de Folin Ciocalteu. Os tubos permaneceram por 30 minutos em banho maria a 40°C, em seguida as amostras foram transferidas para a microplaca e a leitura das absorbâncias a 750 nm foi realizada em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices). Os valores de teores de fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico por litro de cerveja (mg GAL/L).

2.7 Determinação da atividade antioxidante

Foi realizada por 4 quatro métodos distintos. Para possibilitar comparações entre os métodos, todas as análises foram realizadas em comparação com padrão trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e a capacidade antioxidante expressa em mmoles de trolox por litro de cerveja (mmol trolox/L).

2.7.1 DPPH

Método realizado conforme Pires et al. (2017), com adaptações. As amostras foram diluídas 1:40 e foi preparada a curva padrão de trolox com concentração de 0 a 10 µg/mL. As amostras e os pontos da curva padrão foram adicionados, em triplicatas, na microplaca seguido da solução de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), a microplaca foi incubada em ambiente escuro por 30 minutos e a leitura das absorbâncias realizada a 517 nm em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices).

2.7.2 ABTS

Método realizado conforme Torres et al. (2017), com adaptações. As amostras foram diluídas 1:40 e foi preparada a curva padrão de trolox com concentração de 0 a 12 µg/mL. As

amostras e os pontos da curva padrão foram adicionados, em triplicata, na microplaca, seguida da solução de ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico). A microplaca foi incubada por 20 minutos no escuro e a leitura da absorbância realizada a 734 nm, em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices).

2.7.3 FRAP

Método realizado conforme Urrea-Victoria et al. (2016), com adaptações. As amostras foram diluídas 1:20 e foi preparada a curva padrão de trolox com concentração de 0 a 7,5 µg/mL. As amostras e os pontos da curva padrão foram adicionados, em triplicata, na microplaca, seguida do reagente de FRAP (solução de acetato de sódio 0,3 M, solução TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) e cloreto férrico mM). A microplaca foi incubada por 30 minutos no escuro, a 37°C e a leitura da absorbância realizada a 595 nm em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices).

2.7.4 ORAC

Ensaio realizado de acordo com Zulueta et al. (2009). As amostras foram diluídas 1:100, com exceção das amostras do estilo IPA que foram diluídas 1:200, e foi preparada a curva padrão de trolox com concentração de 0 a 120 µM. As amostras e os pontos da curva padrão foram adicionados, em triplicata, na microplaca, seguido da fluoresceína e da solução de AAPH (2,20-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorídrico). A cinética de decaimento da fluorescência foi avaliada por 90 leituras, com intervalo de 1 minuto entre elas, em leitor de microplacas Flex Station III (Molecular Devices). O cálculo da atividade antioxidante foi realizado com base nas leituras de fluorescência em relação ao tempo, através da avaliação da área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína.

2.8 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média ± desvio padrão de, pelo menos, triplicatas. Aplicando o software “Graphpad Prism” (Versão 5.0 - San Diego, CA, USA) usando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. E análise do coeficiente de correlação de Pearson considerando $p \leq 0,05$, foi realizada para relacionar variáveis.

3. Resultados e Discussão

As características físico-químicas da cerveja como a cor, o amargor, teor de carboidratos, proteínas e compostos fenólicos estão relacionados aos ingredientes e processos de fabricação utilizados (Granato et al., 2011).

3.1 Determinação da cor

Para a avaliação da cor da cerveja pode ser utilizada escala EBC, criada pela *European Brewing Convention* e mais utilizada na Europa, e a escala SRM (*Standard Reference Method*), criada pela *American Society of Brewing Chemists*. Os métodos são realizados através da leitura, em espectrofotômetro a 430 nm, da amostra de cerveja. O método CIE L*a*b*, também pode ser usado, é baseado na teoria de cores opostas e tem correlação com a percepção visual, onde L* representa a luminosidade, a percepção entre o claro e o escuro, a* representa o verde ou o vermelho e o b* o azul ou amarelo, a medição da cor é realizada em um colorímetro (Koren et al., 2020).

A BJCP (*Beer Judge Certification Program*) estabelece alguns padrões de cor para cada estilo de cerveja: Pilsen de 4 a 10 EBC, Witbier de 4 a 8 EBC e IPA de 12 a 38 EBC.

Tabela 2. Cores das amostras de cerveja durante o armazenamento pelos métodos EBC e CIE L*a*b*

Amostra	Método EBC	Método		
		L*	a*	b*
Pilsen				
P0	9 ± 0,04 (a)	92 (a)	-1,5 (a)	22 (a)
P3	10 ± 0,05(a)	91 (a,b)	-1,0 (a, b)	23 (b)
P6	11 ± 0,25 (b)	89 (b)	-0,5 (b)	25 (c)
Witbier				
W0	10 ± 1,26(a)	93 (a)	-1,4 (a)	19 (a)
W3	8 ± 0,17(b)	92 (a)	-1,5 (a)	19 (a)
W6	11 ± 0,31(a)	91 (b)	-1,4 (a)	24 (b)
IPA				
I0	35 ± 0,10(a)	78 (a)	9,0 (a)	65 (a)
I3	37 ± 0,31(b)	75 (b)	10 (b)	64 (a)
I6	39 ± 1,10(c)	73 (c)	12 (c)	66 (b)

*Amostras 0 analisadas logo após a produção, amostras 3 com 3 meses e amostras 6 com 6 meses de armazenamento.

*EBC: *European Brewing Convention*

Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras em cada estilo e tempo de armazenamento (p < 0,05).

As amostras do estilo Pilsen, de acordo com o método EBC, apresentaram coloração clara, resultados que corroboram os valores obtidos pelo método L*a*b*. Valores elevados de L* indicam alta luminosidade, baixos valores de a* indicam tonalidade verde e elevados valores de b* representam coloração amarela, resultados característicos do estilo Pilsen (Padrão de 4 a 10 EBC) (Tabela 2). Para P0, P3 e P6, pode-se observar elevação do valor EBC ao longo do tempo, indicando que ocorreu um escurecimento da amostra durante o armazenamento ($p < 0,05$), resultados similares aos das amostras do estilo IPA I0, I3 e I6. Esse fato pode estar relacionado às reações de oxidação e degradação de compostos fenólicos durante o armazenamento, que ocasionam escurecimento da cerveja, como a polimerização de flavonoides e formação de produtos da reação de Maillard que podem influenciar a estabilidade da cor (Callemien & Collin, 2007; Koren et al., 2020).

Para as amostras do estilo Witbier, pelo método EBC, ocorreu significativa alteração na cor no período de 3 a 6 meses de armazenamento ($p < 0,05$), o que também foi observado pelo método L* a* b*, em que as amostras apresentaram um progressivo escurecimento (Tabela 2).

O estilo IPA apresentou maior escurecimento ao longo do tempo, e devido a sua composição de ingredientes com maltes mais torrados e maior quantidade de lúpulo, pode apresentar maior teor de compostos fenólicos que sofrem degradação durante o armazenamento. Nos estilos Pilsen e Witbier o escurecimento foi mais lento, o que pode estar relacionado ao teor e ao perfil de compostos fenólicos encontrados nesses estilos.

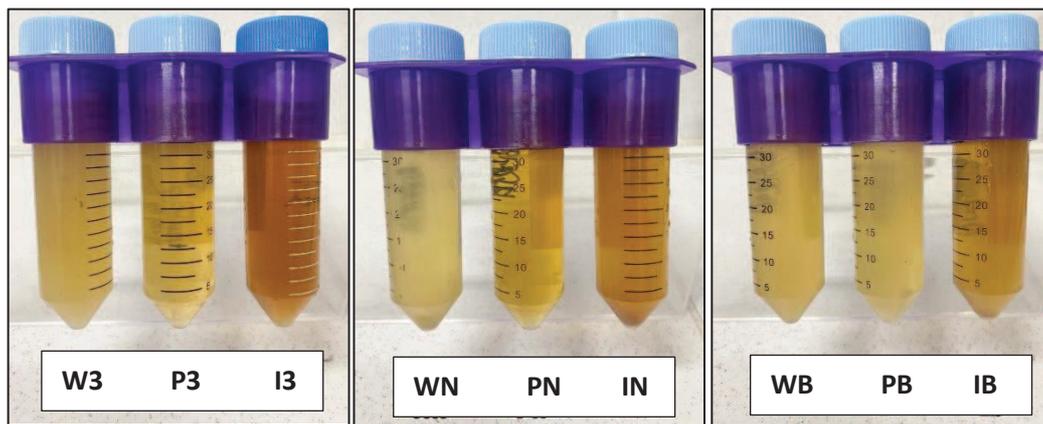
Tabela 3: Cores das amostras das diferentes cervejarias, com 3 meses de armazenamento.

Amostra	Método EBC	Método		
		L*	a*	b*
Pilsen				
P3	10 ± 0,05 (a)	91 (a)	-1,0 (a,b)	23 (a)
PN	14 ± 0,09 (b)	88 (b)	-0,2 (a)	33 (b)
PB	8 ± 0,09 (c)	92 (c)	-1,2 (b)	18 (c)
Witbier				
W3	8 ± 0,17(a)	92 (a)	-1,5 (a,b)	19 (a)
WN	6 ± 0,03 (b)	93 (b)	-1,6 (a)	15 (b)
WB	10 ± 0,15 (c)	92 (c)	-1,0 (b)	19 (c)
IPA				
I3	37 ± 0,31 (a)	75 (a)	10 (a)	64 (a)
IN	23 ± 0,51 (b)	82 (b)	3,0 (b)	48 (b)
IB	14 ± 0,04 (c)	86 (c)	1,0 (c)	32 (c)

*EBC: *European Brewing Convention*

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Para os três estilos, Pilsen, Witbier e IPA foi observada diferença significativa ($p < 0,05$), para análise pelo método EBC, entre as amostras produzidas por diferentes cervejarias e analisadas após 3 meses de armazenamento, pode-se pressupor que os ingredientes e o processo de fabricação influenciaram de forma significativa a cor da bebida entre as diferentes marcas (Tabela 3).



*W3, WN, WB: Witbier. P3, PN, PB: Pilsen. I3, IN, IB: IPA



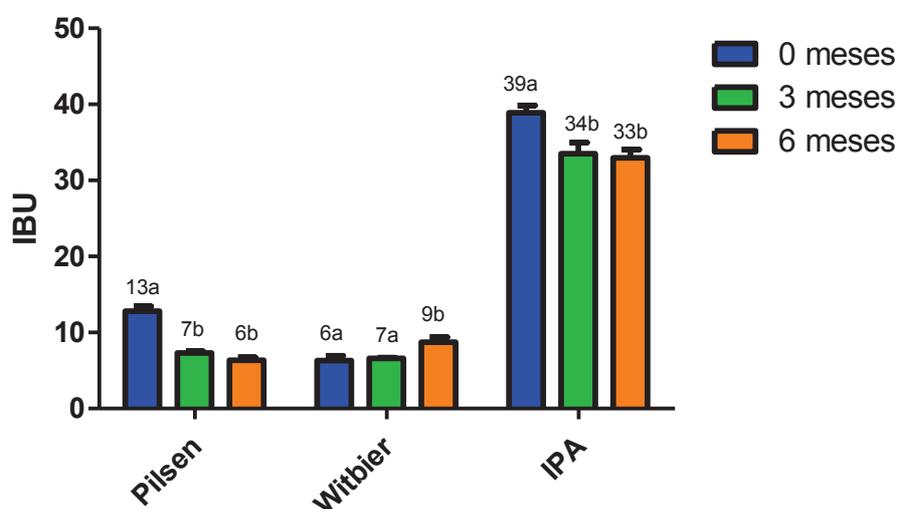
EBC: *European Brewing Convention* Fonte: Adaptado de BJCP Guideline

Figura 1. Cores das amostras das três cervejarias com 3 meses de armazenamento e escala de cores EBC

De acordo com a Figura 1, é possível observar que a maioria das amostras seguiram os padrões de cores especificados pelo BJCP para cada estilo: Pilsen - 4 a 10 EBC, Witbier – 4 a 8 EBC e IPA – 12 a 38 EBC. Amostra W3, WN e WB do estilo Witbier com coloração amarelo e aparência turva, a P3 e PN do estilo Pilsen de cor clara e cristalina, a I3, IN e IB do estilo IPA de cor âmbar-avermelhado. Entretanto a amostra PB não apresentou aparência clara e cristalina, sua aparência foi similar as amostras do estilo Witbier, alguma falha no processo de produção pode ter ocorrido, como por exemplo na etapa de filtração após a fermentação, realizada com o objetivo de clarificar a cerveja para torná-la cristalina (Cimini et al., 2017).

3.2 Determinação do amargor

O amargor da cerveja é um critério utilizado para caracterização de estilos, e depende do teor de iso-alfa-ácidos. A intensidade do amargor é medida com a escala IBU (*International Bitterness Unit*), onde 1 IBU representa cerca de 1 mg de iso-alfa-ácido por litro de cerveja. A medição é realizada por leitura em espectrofotômetro a 275 nm, após a extração dos ácidos com solventes. Valores mais elevados de IBU caracterizam cervejas com sabor mais amargo (Caballero et al., 2012; Morado, 2017). De acordo com a BJCP os valores de amargor para o estilo Pilsen podem variar de 8 a 30 IBU, Witbier de 8 a 20 IBU e IPA de 40 a 70 IBU.



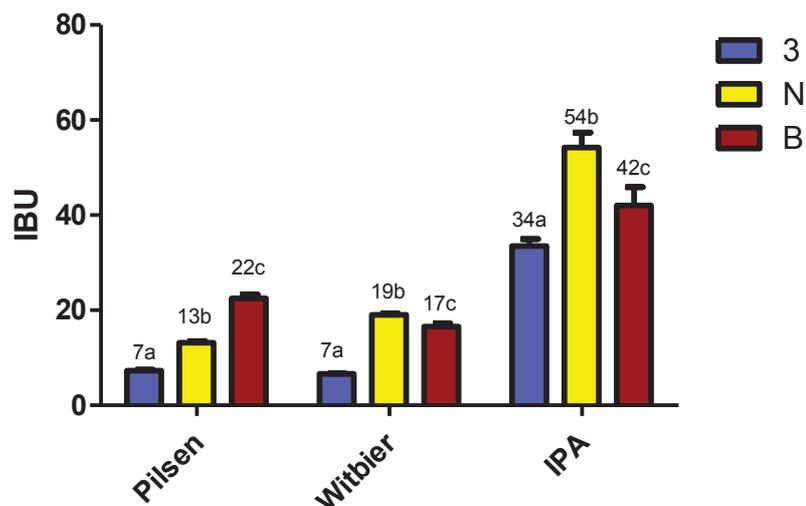
*IBU: *International Bitterness Units*

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Figura 2. Histograma para os valores de amargor (IBU) de acordo com o estilo e o tempo de armazenamento das amostras de cerveja

Durante o período de armazenamento das amostras na garrafa, os estilos Pilsen e IPA apresentaram comportamentos semelhantes, com redução no valor de IBU, no estilo Witbier foi observada uma pequena, porém significativa, elevação do IBU (Figura 2). Da mesma maneira como ocorreu na alteração de cor, as reações de oxidação e degradação de compostos fenólicos podem interferir no amargor. No processo de produção da cerveja, na ebulição do mosto, ocorre a conversão, por isomerização, dos alfa-ácidos dos lúpulos em iso-alfa-ácidos (isohumulona, isocohumulona e isoadhumolona), que podem ser cis ou trans iso-alfa-ácidos. Reações químicas de degradação dos isômeros cis e trans dos iso-alfa-ácidos podem ocorrer na cerveja devido a fatores como a temperatura e tempo de armazenamento, além da exposição à

luz, sendo o isômero cis iso-alfa-ácido mais estável enquanto o trans pode ser degradado mais facilmente. Entretanto, outros fatores, como a variedade dos ingredientes utilizados, podem influenciar a composição de iso-alfa-ácidos e de prenilflavonóides (xanthohumol) da cerveja, que auxiliam na estabilidade oxidativa da bebida. É necessário que mais estudos analisem as reações químicas que ocorrem com estes compostos durante o armazenamento e sua interferência no sabor amargo da bebida (Caballero et al., 2012; Ciriminna et al., 2018; Heuberger et al., 2012).



*IBU: *International Bitterness Units*

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Figura 3. Histograma para amargor (IBU) por estilo, das três cervejarias com 3 meses de armazenamento

Entre as amostras do mesmo estilo e produzidas em diferentes cervejarias, foi possível observar uma grande variação nos valores de IBU (Figura 3), e as amostras do estilo IPA apresentaram IBU mais elevado, o que caracteriza o estilo, que possui maior quantidade de lúpulo adicionado (Strong et al., 2015). Os resultados evidenciam que as variedades de cultivar e genéticas dos lúpulos, as quantidades adicionadas e os diferentes processos de fabricação entre as cervejarias podem influenciar o amargor da bebida final (Caballero et al., 2012; Bettenhausen et al., 2018).

Tabela 4. Valores médios de IBU obtidos nas análises das amostras de cerveja e valores declarados pelos fabricantes no rótulo

Amostra	IBU	IBU Informado no rótulo
Pilsen		
P0	13	10
P3	7	10
P6	6	10
PN	13	10
PB	22	15
Witbier		
W0	6	8
W3	7	8
W6	9	8
WN	19	14
WB	17	11
IPA		
I0	39	60
I3	34	60
I6	33	60
IN	54	60
IB	42	45

*IBU: *International Bitterness Units*

*Amostras 0 analisadas logo após a produção, amostras 3 com 3 meses e amostras 6 com 6 meses de armazenamento.

Ao analisarmos a informação de IBU nos rótulos das cervejas, foi possível observar diferenças entre os valores declarados e o que foi detectado nas análises (Tabela 4). Pressupõe-se que os fabricantes não realizam análises de IBU para todos os lotes produzidos, além disso, não são produzidos rótulos específicos para cada lote de produção. O que poderia explicar essas variações nos valores. A Instrução normativa nº65 do MAPA de 2019, que estabelece os padrões de identidade e qualidade e os parâmetros analíticos para produtos de cervejaria, não define regras para análises e divulgação dos valores de amargor.

3.3 Determinação do teor de carboidratos e proteínas

No preparo do mosto ocorre a ação das enzimas alfa-amilases, beta-amilases e dextrinases que hidrolisam o amido em açúcares fermentáveis, como maltose, maltotriose e glicose (Wenwen et al., 2019). A composição de carboidratos da cerveja está relacionada aos tipos de maltes que fornecem os açúcares para etapa de fermentação (Han et al., 2016). As proteínas, que se encontram em baixos teores na cerveja (0,2 a 2,9 g/L), contribuem para as

características sensoriais como cor, espuma, sabor e estabilidade coloidal (Šedo et al., 2012; Picariello et al., 2017).

Tabela 5: Teor de proteínas (g/L) e carboidratos (g/L) durante o armazenamento das amostras de cerveja por estilo

Amostra	Proteínas (g/L)	Carboidratos (g/L)
Pilsen		
P0	1,59 ± 0,00 (a)	78 ± 5,62 (a,b)
P3	1,59 ± 0,00 (a)	81 ± 6,24 (a)
P6	1,53 ± 0,05 (a)	71 ± 0,86 (b)
Witbier		
W0	1,85 ± 0,06 (a)	91 ± 2,44 (a)
W3	1,71 ± 0,10 (b)	104 ± 2,19 (b)
W6	1,78 ± 0,05(a,b)	95 ± 8,69 (a)
IPA		
I0	1,66 ± 0,01 (a)	126 ± 2,19 (a)
I3	1,63 ± 0,02 (a)	167 ± 9,21 (b)
I6	1,61 ± 0,03(a)	130 ± 7,18 (a)

*Amostras 0 analisadas logo após a produção, amostras 3 com 3 meses e amostras 6 com 6 meses de armazenamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

O teor de carboidratos das amostras analisadas após três e seis meses de armazenamento reduziu ($p < 0,05$) nos três estilos Pilsen, Witbier e IPA (Tabela 5). Bertuzzi et al (2020), observaram que cervejas com fermentação do tipo Ale, geralmente, apresentam maior concentração de açúcares do que as tipo Lager, pois neste tipo de fermentação praticamente todos os açúcares são consumidos pelas leveduras, resultados similares aos encontrados para as amostras P0, P3, P6 que são do tipo Lager e o teor de carboidratos foi menor do que as do estilo Witbier (W0, W3, W6) e IPA (I0, I3, I6) que são do tipo Ale.

Tabela 6: Teor de proteínas (g/L) e carboidratos (g/L) das amostras das cervejarias com 3 meses de armazenamento por estilo

Amostra	Proteínas (g/L)	Carboidratos (g/L)
Pilsen		
P3	1,58 ± 0,00 (a)	81 ± 6,24 (a)
PN	1,71 ± 0,03 (b)	122 ± 3,76 (b)
PB	1,68 ± 0,02 (b)	58 ± 7,24 (c)
Witbier		
W3	1,71 ± 0,10 (a)	104 ± 2,19 (a)
WN	1,66 ± 0,02 (a)	100 ± 531 (a)
WB	1,71 ± 0,00 (a)	74 ± 2,32 (b)
IPA		
I3	1,64 ± 0,01 (a)	171 ± 6,84 (a)
IN	1,71 ± 0,01 (a)	89 ± 4,29 (b)
IB	1,67 ± 0,06 (a)	58 ± 8,85 (c)

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Entre as amostras das diferentes cervejarias, ocorreram diferenças significativas nos teores de carboidratos para as amostras do mesmo estilo (Tabela 6), o que pode ser influenciado pelo processo de produção, quantidade e tipos de ingredientes (Bettenhausen et al., 2018).

O teor de proteínas na cerveja é considerado relativamente baixo, em torno de 0,2 a 2,9 g/L, quando comparado com outros alimentos ricos em proteínas (Picariello et al., 2011). A maioria das proteínas identificadas na cerveja são provenientes dos maltes de cevada, de cereais não maltados como milho, aveia e trigo, e das leveduras que realizam a fermentação como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. Os tipos de proteínas comumente encontrados são: as serpinas como a proteína Z, em maior abundância são encontradas as lipoproteínas, seguida das proteínas de armazenamento como as hordeínas da cevada, gluteninas e gliadinas do trigo, avenina da aveia e secalinas do centeio, proteínas inibidoras de tripsina assim como de alfa-amilase e proteínas de defesa (Grochalová et al., 2017). As proteínas são essenciais para a qualidade sensorial da bebida, como a formação e estabilidade da espuma, e podem provocar aparência turva devido à presença de proteínas insolúveis (Jin et al., 2012).

O teor de proteínas das amostras avaliadas logo após a produção e durante o armazenamento (Tabela 5) ficou na faixa central dos valores encontrados na literatura (1,53 a 1,85 g/L) e apresentou pequena variação no estilo Witbier e nos estilos Pilsen e IPA manteve-se similar nos três períodos de análise. A manutenção, relativamente, estável dos teores de proteínas pode estar relacionada ao processo de pasteurização das cervejas na garrafa, pois, de

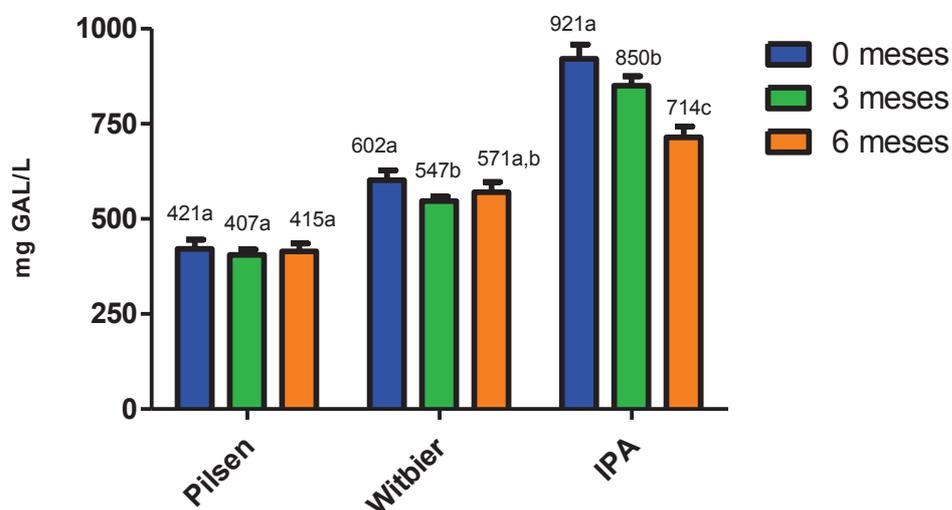
acordo com Lund et al. (2012), nas cervejas pasteurizadas ocorre a inativação de enzimas derivadas das leveduras que provocam hidrólise de proteínas durante o armazenamento.

As amostras do estilo Witbier (W0, W3 e W6) apresentaram maior teor de proteínas ($p < 0,05$) do que o estilo Pilsen (P0, P3 e P6) e para o estilo IPA foi mais elevado ($p < 0,05$) em comparação, apenas com as amostras I0 e I6. Não houve diferença significativa entre os estilos Pilsen e IPA. O estilo Witbier possui malte de trigo e aveia em sua composição, que contêm teores de proteínas mais elevados e podem ter influenciado este resultado (Picariello et al., 2015).

Entre as amostras das diferentes cervejarias, apenas o estilo Pilsen apresentou uma pequena diferença nos teores de proteínas ($p < 0,05$), nos outros estilos não houve diferença significativa (Tabela 6).

3.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

As cervejas do estilo Pilsen e Witbier não apresentaram variações significativas no teor de fenólicos totais durante o armazenamento, entretanto no estilo IPA ocorreu uma redução de cerca de 20% no teor de fenólicos ao longo do período e mesmo com essa redução permaneceu mais elevado do que os outros estilos (Figura 4).



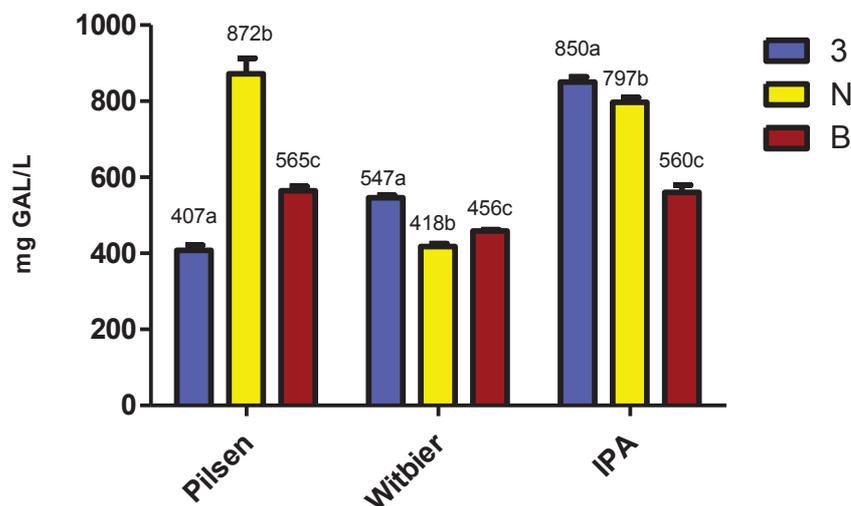
*mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Figura 4: Teor de fenólicos totais (mg GAL/L) de acordo com o estilo e o tempo de armazenamento das amostras de cerveja

Estudos que analisaram os teores de fenólicos totais de cervejas dos tipos Lager e Ale, verificaram maiores teores de compostos fenólicos nas do tipo Ale e nas cervejas de coloração escura (Marques et al., 2017; Granato et al., 2011; Habschied et al., 2020; Moura-Nunes et al., 2016; Piazzon et al., 2010; Rodrigues et al., 2011; Zhao et al., 2010, 2013). Resultados que estão de acordo com o que foi encontrado para as amostras P0, P3, P6, W0, W3, W6, I0, I3 e I6. Sendo que as amostras do estilo IPA além de apresentarem coloração mais escura, possuem elevada quantidade de lúpulo na sua formulação que também contribui para aumentar os teores de fenólicos totais. Com isso, é possível relacionar os compostos fenólicos com as alterações observadas na cor e amargor durante o armazenamento.

Ao longo do tempo, podem ocorrer alterações nos teores de compostos fenólicos devido aos tipos de ingredientes utilizados, o processo de produção, através de reações de oxidação ou polimerização com moléculas de proteínas tornando-os insolúveis (Li et al., 2016).



*mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo ($p < 0,05$).

Figura 5: Teor de fenólicos totais (mg GAL/L) por estilo, das amostras de cerveja com 3 meses de armazenamento das diferentes cervejarias.

A comparação entre as amostras das diferentes cervejarias permitiu observar que em todos os estilos os teores de compostos fenólicos apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) (Figura 5). No entanto, diferente do que foi observado na literatura, a amostra Pilsen N é do tipo Lager e possui coloração clara, apresentou elevado teor de fenólicos totais. E a amostra Pilsen B foi similar a IPA B.

3.5 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante da cerveja é proveniente de compostos oriundos dos ingredientes e do processo de produção. No processo de maltagem e secagem dos grãos e no preparo do mosto, os antioxidantes são formados devido à elevação da temperatura, que provoca a reação de açúcares redutores com aminoácidos ou grupos amino de proteínas, levando à formação dos produtos da reação de Maillard, que possuem elevado poder de redução. (Carvalho et al., 2014).

Os compostos fenólicos constituem uma classe de antioxidantes naturais provenientes de vegetais e podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres e inibidores de oxigênio singlete, a atividade antioxidante exercida por esses compostos pode variar de acordo com suas características estruturais. Estudo que avaliou a atividade antioxidante de compostos fenólicos na cerveja, observou o seguinte comportamento: ácido gálico > epicatequina > ácido cafeico > catequina > ácido sinápico > ácido clorogênico > ácido protocatecuico > ácido ferúlico (Leitão et al., 2011).

Tabela 7: Atividade antioxidante durante o armazenamento para cada estilo de cerveja

Amostra	DPPH mmol Trolox/L	FRAP mmol Trolox/L	ABTS mmol Trolox/L	ORAC mmol Trolox/L
Pilsen				
P0	0,13 ± 0,00 (a,b)	0,12 ± 0,00 (a)	0,65 ± 0,01 (a)	16,71 ± 0,62 (a)
P3	0,11 ± 0,01 (a)	0,11 ± 0,00 (b)	0,50 ± 0,02 (b)	10,64 ± 0,54 (b)
P6	0,15 ± 0,01 (b)	0,11 ± 0,00 (b)	0,42 ± 0,07(b)	13,29 ± 0,95 (a,b)
Witbier				
W0	0,10 ± 0,02 (a)	0,11 ± 0,00 (a)	0,53 ± 0,05 (a)	12,61 ± 0,35 (a)
W3	0,15± 0,01 (b)	0,11 ± 0,00 (a)	0,58 ± 0,02 (a)	13,65± 0,77(a)
W6	0,13± 0,01 (a,b)	0,12 ± 0,00 (b)	0,72 ± 0,01 (b)	12,36± 0,43 (a)
IPA				
I0	0,23 ± 0,01 (a)	0,17 ± 0,00 (a)	0,83 ± 0,10 (a,b)	26,63± 3,44(a,b)
I3	0,30 ± 0,02 (b)	0,17 ± 0,00 (a,b)	0,73 ± 0,03 (a)	29,21± 2,07(a)
I6	0,21 ± 0,02 (a)	0,16 ± 0,01 (b)	0,84 ± 0,03 (b)	23,29± 0,80 (b)

*Amostras 0 analisadas logo após a produção, amostras 3 com 3 meses e amostras 6 com 6 meses de armazenamento. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo (p < 0,05).

A análise da capacidade antioxidante das amostras durante o armazenamento pelos diferentes métodos, demonstrou que os resultados para o método FRAP foram menores para todas as amostras, seguido do DPPH, ABTS e ORAC com resultados bem mais elevados, acima de dez vezes. O ensaio de ORAC é considerado o mais sensível a pequenas variações por ser o

único método, entre os realizados, fluorimétrico e não colorimétrico, baseado na transferência de átomos de hidrogênio que usa o radical peroxila, considerado biologicamente relevante por ser encontrado em alimentos e seres vivos (Zulueta et al., 2009; Tafulo et al., 2010).

Para as amostras do estilo Pilsen a atividade antioxidante manteve-se, relativamente estável ou apresentou pequenas variações, no método ABTS e FRAP ocorreu redução da atividade, resultados similares aos de Li et al., (2016) que analisaram cervejas do tipo Lager durante o armazenamento e observaram redução da atividade antioxidante após quatro meses. A Witbier apresentou elevação da atividade em FRAP e ABTS e a IPA redução pelo método de FRAP ao longo do armazenamento (Tabela 7).

Em todos os métodos o estilo IPA apresentou valores mais elevados de atividade antioxidante, estudos observaram que cervejas com fermentação do tipo Ale apresentam maior atividade antioxidante devido a elevada temperatura que aumenta a extração de compostos fenólicos, e este estilo apresenta maior quantidade de maltes escuros que possuem mais compostos antioxidantes, além disso, o estilo IPA possui maior teor alcoólico, o que eleva a solubilidade de compostos fenólicos (Humia et al, 2019; Carvalho et al., 2014, Tafulo et al 2010).

Tabela 8: Atividade antioxidante para cada estilo de cerveja das diferentes cervejarias

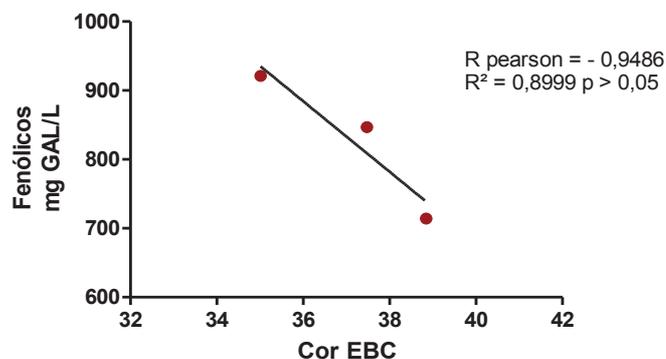
Amostra	DPPH mmol Trolox/L	FRAP mmol Trolox/L	ABTS mmol Trolox/L	ORAC mmol Trolox/L
Pilsen				
P3	0,11 ± 0,01 (a)	0,11 ± 0,00 (a)	0,50 ± 0,02 (a)	10,64 ± 0,55(a)
PN	0,15 ± 0,01 (b)	0,12 ± 0,00 (b)	0,77 ± 0,05(b)	11,72± 0,91(a,b)
PB	0,16 ± 0,01 (b)	0,12 ± 0,00 (b)	0,70 ± 0,07(b)	13,34± 0,56(b)
Witbier				
W3	0,15 ± 0,01 (a)	0,12 ± 0,00 (a)	0,58 ± 0,02 (a)	13,65± 0,77(a)
WN	0,12 ± 0,01 (a)	0,11 ± 0,00 (a)	0,53 ± 0,07(a)	9,12 ± 0,50(b)
WB	0,12 ± 0,03 (a)	0,11 ± 0,00 (a)	0,54 ± 0,01(a)	12,15± 0,79(a)
IPA				
I3	0,30 ± 0,02 (a)	0,16 ± 0,00 (a)	0,73 ± 0,04 (a)	29,21± 2,08(a)
IN	0,19 ± 0,01 (b)	0,15 ± 0,00 (b)	0,91 ± 0,09(b)	23,57± 0,06(b)
IB	0,17 ± 0,03 (b)	0,12 ± 0,00 (c)	0,70 ± 0,05 (a)	29,31± 0,34(a)

*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo (p < 0,05).

As análises das amostras de diferentes marcas apresentaram resultados similares ou com pequenas variações, entre os estilos em todos os métodos (Tabela 8). Os resultados de ORAC foram os mais elevados e o estilo IPA apresentou a maior atividade antioxidante.

3.6 Análises de correlação

Para verificar a relação entre as características de cor, amargor, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante das amostras analisadas durante o armazenamento, foram realizadas análises de correlação de Pearson e regressão linear.

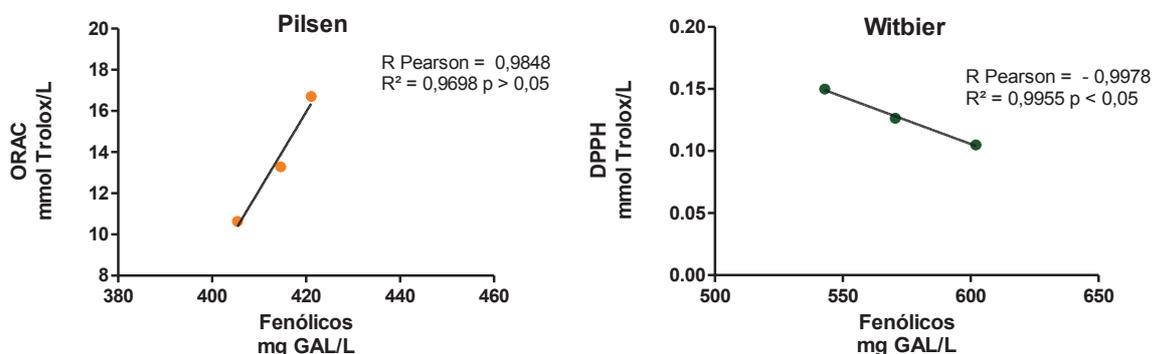


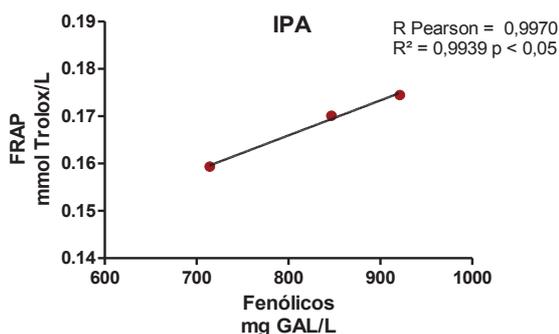
*EBC: *European Brewing Convetion*

*mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

Figura 6: Correlação de Pearson entre cor (EBC) e teor de compostos fenólicos totais (mg GAL/L) para o estilo IPA

A correlação entre a cor e o teor de compostos fenólicos totais não foi significativa para nenhum dos estilos, entretanto a IPA apresentou valores de R e R² que caracterizam uma possível relação entre os dados, indicando que o escurecimento aumenta e o teor de fenólicos diminui (Figura 6).

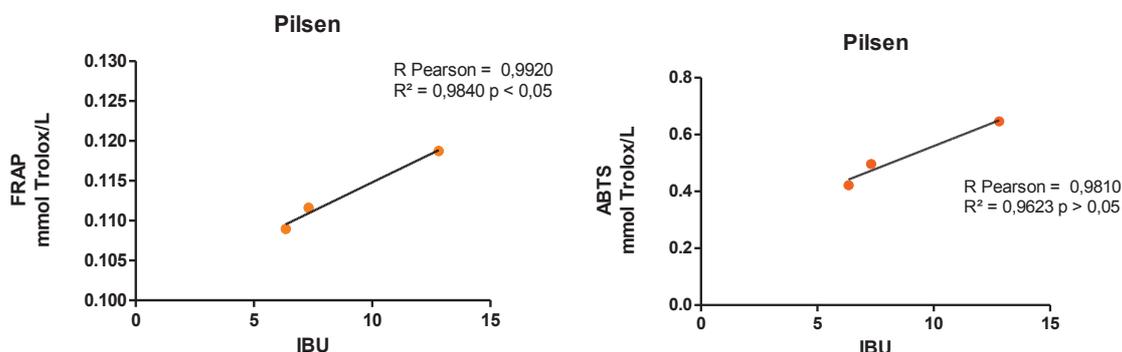


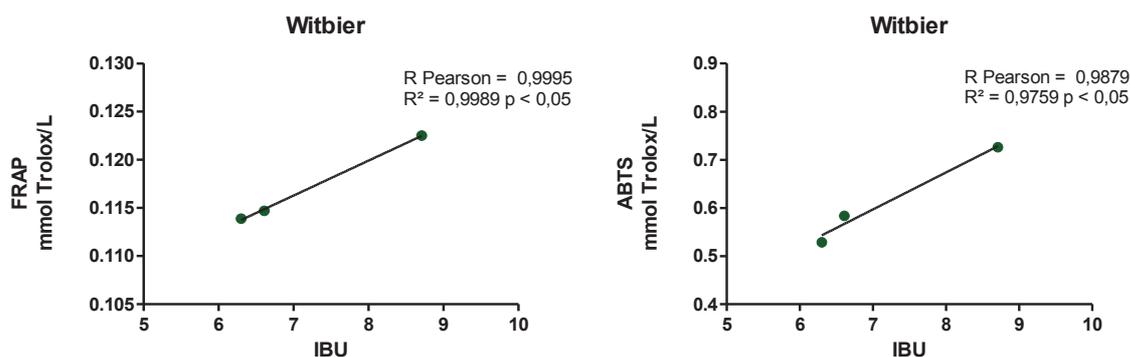


*mg GAL/L: miligramas de ácido gálico por litro

Figura 7: Correlação entre atividade antioxidante (mmol Trolox/L) e teor de compostos fenólicos totais (mg GAL/L) para os estilos Pilsen, Witbier e IPA

A correlação para atividade antioxidante e teor de fenólicos totais para a Pilsen apresentou uma possível relação com o ensaio de ORAC, mas não foi significativa em nenhum dos métodos de análise antioxidante realizados. A Witbier apresentou correlação com o método DPPH e a IPA com FRAP (Figura 7). Cada método para análise de antioxidantes é capaz de detectar diferentes formas de atividade, devido ao seu modo de ação. Alguns estudos observaram diferentes correlações entre os ensaios antioxidantes e o perfil de compostos fenólicos, Granato et al., (2011), verificaram que compostos não pertencentes a classe dos flavonóides correlacionaram com o método DPPH. Entretanto Zhao et al., (2010) verificaram correlação com os ensaios de ORAC e DPPH devido à presença dos compostos catequina, protocatecuico, ácido cafeico e ácido siríngico.





*IBU: *International Bitterness Units*

Figura 8: Correlação entre atividade antioxidante (mmol Trolox/L) e amargor (IBU) para os estilos Pilsen, Witbier

A relação entre atividade antioxidante e amargor não foi significativa para o estilo IPA. A Pilsen apresentou significativa correlação para o método FRAP ($p < 0,05$), para ABTS não foi significativa, mas os valores do coeficiente de Pearson e regressão linear indicam uma possível relação. As amostras de estilo Witbier apresentaram elevada correlação com os ensaios de FRAP e ABTS ($p < 0,05$) (Figura 8). O lúpulo, ingrediente responsável pelo amargor, possui elevado teor de compostos fenólicos como ácidos fenólicos, prenilflavonóides e catequinas que podem influenciar a atividade antioxidante da cerveja (Moura-Nunes et al., 2016).

4. Considerações Finais

A cerveja é uma mistura complexa de diversos compostos que podem sofrer alterações em todas as etapas de produção e durante o armazenamento. A cor da bebida escureceu e o amargor reduziu durante o armazenamento, devido a possíveis reações de oxidação e degradação de compostos fenólicos e iso-alfa-ácidos, respectivamente. Os teores de proteínas mantiveram-se estáveis e os carboidratos apresentaram elevada variabilidade entre os estilos. Os teores de fenólicos totais se destacaram no estilo IPA assim como a atividade antioxidante. E durante o armazenamento apresentaram pequenas variações ou permaneceram estáveis. Em alguns estilos a atividade antioxidante apresentou correlação com o teor de compostos fenólicos e com o amargor. As diferenças de resultados entre as marcas analisadas, permitem concluir que os tipos de ingredientes e o processo de produção podem influenciar a composição final da bebida.

CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

1. Introdução

Os compostos fenólicos encontrados na cerveja podem influenciar suas características sensoriais e sua capacidade antioxidante, que está relacionada à estabilidade oxidativa da bebida. Os tipos e a concentração de compostos fenólicos podem variar de acordo com o estilo, o processo de produção, os maltes, cereais e lúpulos utilizados, além de apresentarem diferenças na composição nutricional devido a características genéticas e condições ambientais durante o cultivo. Geralmente, nas cervejas artesanais são usados apenas maltes de cevada ou de trigo e lúpulo e não são adicionados aditivos, açúcares ou outros cereais, isto pode influenciar a composição de polifenóis, permitindo a identificação, nas cervejas artesanais, de diferente compostos (Cheiran et al., 2019).

Durante o armazenamento o comportamento dos compostos fenólicos pode variar de acordo com a classe a que pertencem, entretanto, estas informações não estão totalmente esclarecidas (Zhao et al., 2015). Sendo assim, este capítulo teve o objetivo de investigar o perfil de polifenóis em amostras de cervejas de três estilos diferentes, Pilsen, Witbier e IPA analisadas durante o período de vida útil, além de comparar os resultados com amostras dos mesmos estilos de outra marca.

2. Metodologia

2.1 Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS)

O perfil de compostos fenólicos foi determinado, por UPLC-MS/MS, em 12 amostras de cervejas (P0, P3, P6, W0, W3, W6, I0, I3, I6, PN, WN, IN), com base na análise das estruturas moleculares por classes e os compostos foram relativamente quantificados de acordo com a sua abundância normalizada.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com Cheiran et al., (2019) com adaptações. Inicialmente o álcool de todas as amostras (15 mL) foi evaporado em centrífuga à vácuo (Savant, SpeedVac., Thermo) por 20 minutos a 20°C, em seguida 5 mL de cada amostra foi acidificado com 85µL de HCL (38%) e centrifugados por 10 minutos a 8°C e 14.000 rpm (Centrífuga Multifuge XR3, Datamed, Thermo Scientific).

A extração em fase sólida utilizou cartuchos Oasis[®] HLB e foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo (KNF Laboport mini-pump, N818). Os cartuchos foram ativados com 2 mL de metanol, condicionados com 2 mL de água Milli-Q, em seguida foi adicionado 1 mL de amostra, os cartuchos foram lavados com 2 mL de água Milli-Q e as amostras foram eluídas em 2mL de metanol (Figura 1).

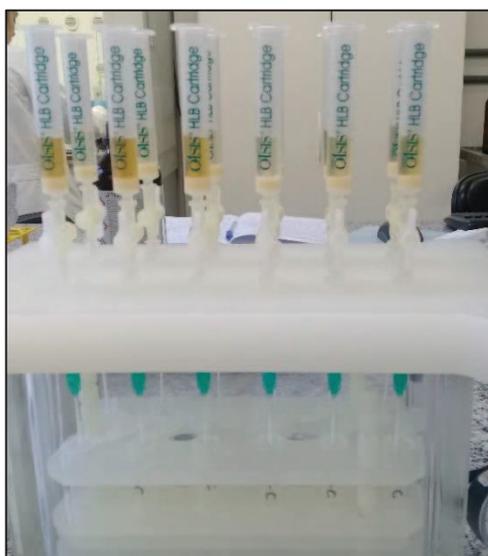


Figura 1: Extração das amostras de cerveja em cartuchos Oasis[®] HLB

As amostras foram então evaporadas em centrífuga à vácuo (Savant, SpeedVac., Thermo) até o volume de 300 μ L e foram ressuspendidas para 1 mL de fase móvel (A: água ultrapura, 0,3 % ácido fórmico, 5mM NH₄HCO₂ e B: acetonitrila, 0,3 % ácido fórmico), filtradas em filtro PTFE hidrofílico (Analítica) 0,22 μ m e armazenadas em *vials* a 8°C. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata.

A determinação do perfil de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Santos et al. (2019), com modificações. As amostras foram injetadas no sistema de cromatografia líquida de ultra performance Acquity UPLC (Waters Co., EUA) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Xevo-G2S-QTOF (Waters Co., EUA) equipado com fonte de ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-) e analisadores de massas tipo quadrupolo e tempo de voo (QTOF). A separação cromatográfica foi realizada com coluna HSS T3 C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m diâmetro de partícula - Waters), mantida a 30°C. As amostras foram mantidas a 8°C até serem injetadas, os volumes de injeção das amostras foram 5 μ L, com vazão de 0,5 mL/min, utilizando o gradiente das fases móveis A (água ultrapura, 0,3 % ácido fórmico, 5mM

NH₄HCO₂) e B (acetonitrila, 0,3 % ácido fórmico): 0,0 min - 97 % A; 11,80 min - 50 % A; 12,38 min - 15 % A; 14,23 min - 15 % A; 14,70 min - 97% A.

Os dados foram coletados em modo MS^E, utilizando argônio como gás de colisão, com aplicação simultânea de baixa e alta energia de fragmentação, com rampa de energia de colisão variando entre 30 e 50 V. A aquisição dos dados foi feita em modos negativos e centroides entre *m/z* 50 e *m/z* 1000 e as condições de ionização foram: voltagem do cone 30 V e do capilar 3.0 kV; gás de dessolvatação (N₂) 1200 L/h à 600°C; gás do cone 50 L/h e temperatura da fonte 150°C. Todas as aquisições foram feitas usando Leu-Enc (*m/z* 554,2615, [M-H] -) para a calibração na concentração de 1 ng/L, em solução de água ultrapura e acetonitrila (50:50, v/v), com 0,1% de ácido fórmico. Para garantir a reprodutibilidade do equipamento e para a confirmação dos compostos fenólicos identificados, um mix contendo 33 padrões comerciais de compostos fenólicos foi preparado a 10 ppm e injetado em triplicata antes das injeções das amostras.

O *software* MassLynx v 4.1 (Waters) foi usado para adquirir dados MS. O *software* Progenesis QI for Metabolomics (Waters) foi usado para normalizar, alinhar, identificar, comparar e quantificar metabólitos. A identificação por comparação dos dados com corridas de padrões de compostos fenólicos foi baseada na distribuição de isótopos de massa neutra, o tempo de retenção e os espectros de fragmentos de MS/MS, aplicando-se a ferramenta MetaScope integrada ao software Progenesis. Os compostos não identificados por comparação com padrões foram comparados a um banco de dados customizado (PubChem). As tentativas de identificação foram realizadas utilizando: erro de massa exata de precursores e fragmentos (< 10 ppm); similaridade isotópica (> 80%); score (> 30) e maior score de fragmentação. Os metabólitos foram considerados identificados e anotados segundo as diretrizes da Metabolomics Standard Initiative (Sumner et al., 2007). Os compostos fenólicos identificados foram classificados utilizando a base de dados PhenolExplorer (<http://phenol-explorer.eu/>), dados de literatura e características químicas da molécula. Após o processamento de dados no Progenesis QI, os dados foram exportados para planilhas de Excel para cálculo da média da abundância relativa por meio da contagem total de íons (TIC, Total Ion Count) dos compostos identificados em 3/3 das replicatas. Além disso, apenas os compostos com coeficiente de variação (CV) < 30% foram considerados.

As Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos foram aplicadas para análise multivariada não-supervisionada usando o programa XLSTAT (versão 2018.5, Addinsoft Inc., NY, USA) e MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca), respectivamente. Adicionalmente, a análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados

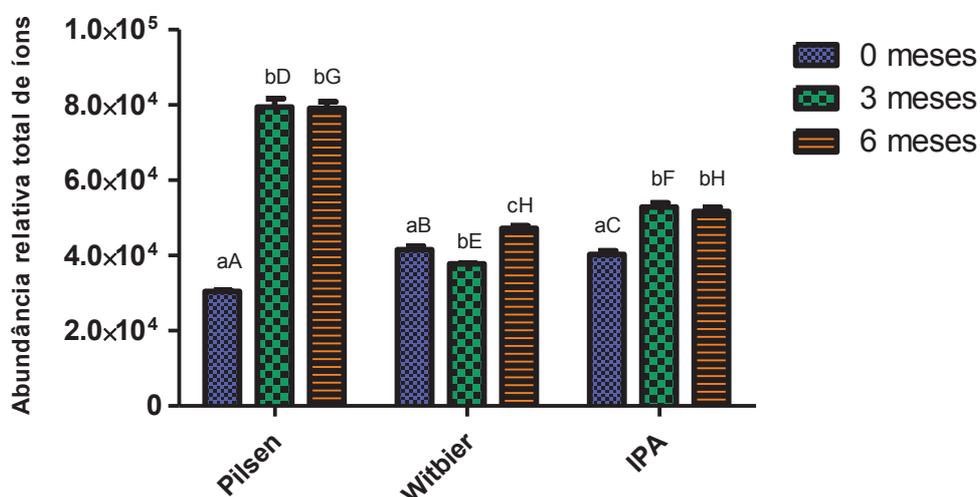
parciais (OPLS-DA) foi aplicada para selecionar os metabólitos que foram identificados como contribuintes na separação dos pontos no tempo (representando potenciais biomarcadores) entre $1 < p(\text{corr}) < -1$, usando o programa EZInfo (versão 3.0, Umetrics, Umea, Sweden).

3. Resultados e Discussão

Foram identificados 65 compostos fenólicos nas amostras de cerveja (Tabela 2), classificados em ácidos fenólicos (55%), flavonóides (31%), lignanas (2%) e outras classes (12%).

3.1 Compostos fenólicos identificados e abundância relativa

Nos três estilos analisados durante o armazenamento a abundância relativa aumentou ao longo do tempo e o estilo Pilsen apresentou o maior valor entre todas as amostras (Figura 2). Entretanto o número de identificações de diferentes compostos foi mais elevado para o estilo IPA (Figura 3) e apresentou pequena variação durante o armazenamento nos três estilos.



*Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os estilos ($p < 0,05$).

Figura 2: Abundância relativa total de compostos fenólicos durante o armazenamento nas cervejas de diferentes estilos

No estilo IPA e Witbier foram identificados compostos exclusivos, o que permite diferenciar as amostras e estilos (Tabela 1). No estilo IPA são adicionados variados lúpulos e

em maior quantidade do que nos outros estilos, que podem influenciar a composição de compostos fenólicos. Os compostos exclusivos para o estilo IPA foram: ácido clorogênico, ácido 4-cumaroilquínico e o glicosídeo do ácido p-coumárico, que já foram detectados em maltes e lúpulos (Callemien & Collin, 2009). No estilo Witbier são adicionados trigo, laranja ou limão, os compostos exclusivos foram: eriocitrina, gardenina B e phlorin que já foram identificados em frutas cítricas e apigenina-7- apioglicosídeo, isômero encontrado no trigo (Santos et al., 2019; Louche et al., 2000; Miyake et al., 1997).

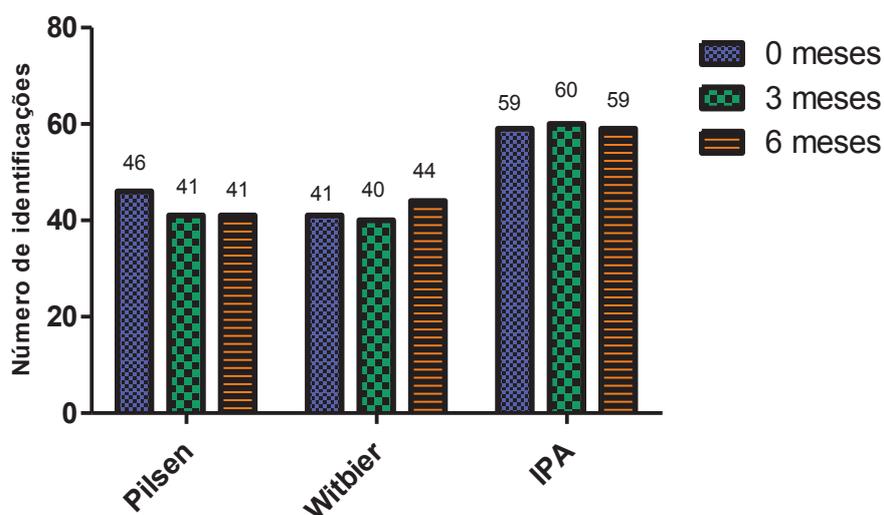
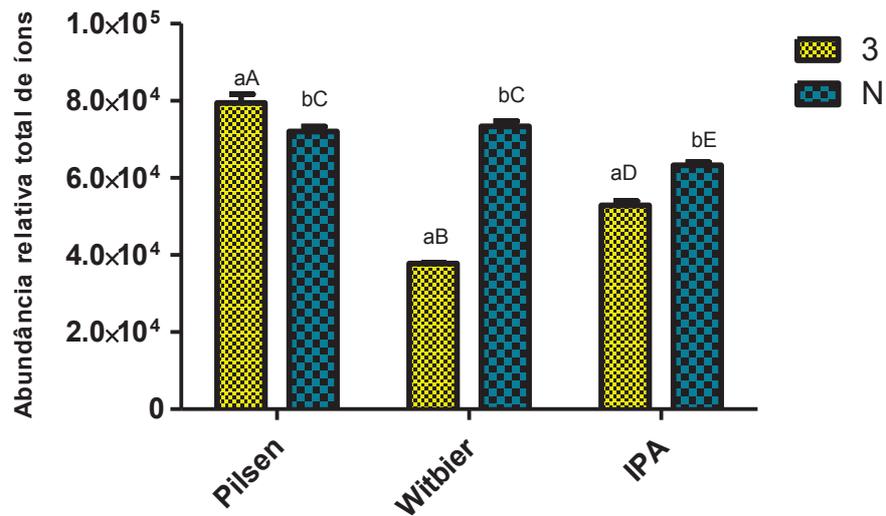


Figura 3: Quantitativo de compostos fenólicos identificados durante o armazenamento nas cervejas de diferentes estilos

Tabela 1: Compostos fenólicos identificados exclusivamente nos estilos IPA e Witbier

Compostos Fenólicos	Fórmula	Amostras
Ácido Clorogênico isômero 1	$C_{16}H_{18}O_9$	I0, I3, I6
Ácido Clorogênico isômero 2	$C_{16}H_{18}O_9$	I0, I3, I6
Ácido 4-Cumaroilquínico isômero 2	$C_{16}H_{18}O_8$	I0, I3, I6
Ácido 4-Cumaroilquínico isômero 4	$C_{16}H_{18}O_8$	I0, I3, I6
Ácido p-coumarico glicosídeo	$C_{15}H_{18}O_8$	I0, I3, I6, IN
Luteolina 7- rutinósido isômero 2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	I0, I3, I6, IN
Apigenina-7- apioglicosídeo isômero 1	$C_{26}H_{28}O_{14}$	IN, W0, W3, W6, WN
Ácido feruloil tartárico	$C_{14}H_{14}O_9$	W3, W6
Eriocitrina isômero 1	$C_{27}H_{32}O_{15}$	WN
Gardenina B	$C_{19}H_{18}O_7$	WN
Phlorin	$C_{12}H_{16}O_8$	W0, W3

A comparação da abundância relativa das duas marcas mostra que o estilo Pilsen apresentou os maiores valores, seguido da Witbier da marca N (Figura 4). O número de compostos identificados nas amostras dos estilos Pilsen e Witbier da marca N foram mais elevados. E o estilo IPA para as duas marcas obteve o maior número de identificações (Figura 5).



*Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as amostras do mesmo estilo; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os estilos ($p < 0,05$).

Figura 4: Abundância relativa total de compostos fenólicos por estilos de duas marcas diferentes de cerveja

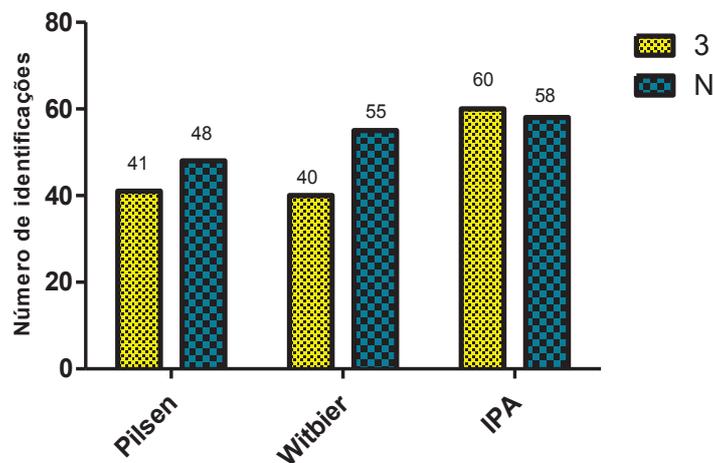


Figura 5: Quantitativo de compostos fenólicos identificados, por estilos, de duas marcas diferentes de cerveja

Tabela 2: Compostos fenólicos identificados nas amostras de cerveja artesanal

Nome*	Fórmula	m/z	RT (min)	Score (%)	FS (%)	Fragmentação	Erro massa (ppm)	IS (%)
Phenolic acids								
Gallic acid ^a	C ₇ H ₆ O ₅	169,01325	1,85	53,8	76,7	2376.5802 (8.55); 27782.8694 (100); 8197.2149 (29.50)	-5,84	99,15
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid ^a	C ₈ H ₈ O ₄	167,03394	3,03	37,4	0	nd	-6,21	94,09
3-O-Methylgallic acid/4-O-Methylgallic acid ^c	C ₈ H ₈ O ₅	183,02866	3,10	41,7	24,2	1090.0223 (16.60); 709.4801 (10.81)	-6,73	92,11
Feruloyl tartaric acid ^b	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325,05444	3,80	37,4	7,32	183.59 (23.87)	-6,35	86,82
Homovanillic acid isomer 1 ^c	C ₉ H ₁₀ O ₄	181,04961	4,51	48,2	49,3	1676.3377 (100); 3284.1310 (32.54)	-5,60	98,12
Homovanillic acid isomer 2 ^c	C ₉ H ₁₀ O ₄	181,04949	5,96	50,6	68,8	3724.8697 (7.35); 13534.1288 (26.72); 9672.0223 (19.09); 11742.6862 (23.18); 3453.7157 (6.82); 50657.3997 (100)	-6,27	91,34
Chlorogenic acid ^a	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08637	5,92	41,6	26,7	13931.7523 (24.13)	-4,07	86,04
Chlorogenic acid isomer 1 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08649	4,55	44	29,2	5475.2399 (62.84); 5371.8829 (61.66)	-3,73	94,98
Chlorogenic acid isomer 2 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08638	6,14	39,1	12,2	3379.991 (8.16); 3335.7680 (8.06)	-4,04	88,01
Gentisic acid ^a	C ₇ H ₆ O ₄	153,01821	5,08	37,6	0	nd	-7,27	96,40
4-Hydroxybenzoic acid ^a	C ₇ H ₆ O ₃	137,02342	5,08	57,3	95,2	8764.4618 (100)	-7,20	99,50
4-Coumaroylquinic acid isomer 1 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,09130	5,39	51,4	75,2	10108.3568 (100)	-4,71	87,19
4-Coumaroylquinic acid isomer 2 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,09186	6,53	36,9	3,31	2411.3257 (59.46)	-3,04	84,65
4-Coumaroylquinic acid isomer 3 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,09125	6,92	43,6	36,4	1803.6892 (13.05); 4110.1533 (29.74); 2049.1700 (14.83); 1024.8172 (7.41); 1301.1898 (9.41); 869.9689 (6.29); 440.2411 (3.19); 4113.0246 (33.45); 1517.5226 (10.96); 5672.9688 (41.04)	-4,84	86,94
4-Coumaroylquinic acid isomer 4 ^c	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337,09167	7,46	41,2	15,7	984.2733 (1.35); 11209.5068 (15.37); 1848.6910 (2.53); 17118.2480 (23.47); 762.3865 (1.05); 5744.0321	-3,62	94,54

							(7.87); 1048.1526 (1.44); 4850.0498 (6.65)		
3-Hydroxyphenylacetic acid/2,4-Dihydroxyacetophenone/2-Hydroxyphenylacetic acid/4-Hydroxyphenylacetic acid/vanillin/Mandelic acid ^c	C ₈ H ₈ O ₃	151,03901	5,85	40,7	17,2		1170.93 (16.36)	-6,93	94,00
m-Coumaric acid isomer 1/p-Coumaric acid/o-Coumaric acid ^c	C ₉ H ₈ O ₃	163,03902	6,08	42	23,3		2510.7931 (48.44); 3715.3428 (71.67)	-6,40	94,17
m-Coumaric acid isomer 2/p-Coumaric acid/o-Coumaric acid ^c	C ₉ H ₈ O ₃	163,03904	7,53	49,3	54,4		4291.6463 (10.56); 1184.7973 (2.92); 40638.5539 (100)	-6,27	99,38
Caffeic acid ^b	C ₉ H ₈ O ₄	179,03394	6,30	51,8	66		29357.2953 (100); 23320.2127 (79.44); 5049.9694 (17.20)	-5,78	99,66
Feruloylquinic acid isomer 1 ^c	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,10217	6,10	44,2	31,9		2510.7931 (14.08); 1082.1442 (6.07); 4547.1881 (25.49); 17837.5536 (100); 432.9891 (2.43); 428.3527 (2.40)	-3,49	93,29
Feruloylquinic acid isomer 2 ^c	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367,10230	7,28	41,3	17		4823.0893 (10.50); 523.3956 (1.14); 12729.2830(27.71); 2984.1701 (6.50)	-3,15	93,31
Phenacetyl glycine ^b	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	192,06552	7,32	41,1	14,8		16979.9954 (29.16); 2984.1701 (5.12)	-5,70	97,46
Cinnamic acid ^b	C ₉ H ₈ O ₂	147,04405	7,34	41,8	26,6		2471.1819 (14.55); 3104.8730 (18.29)	-7,47	90,60
Methoxyphenylacetic acid ^a	C ₉ H ₁₀ O ₃	165,05476	7,34	55,5	85,4		2471.1819 (4.24); 3104.8730 (5.33); 16979.9954 (29.16); 58238.6230 (100); 35877.5564 (61.60)	-5,77	98,70
Feruloyl glucose ^b	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355,10214	7,40	37,7	4,5		4328.3608 (3.49)	-3,71	88,33
Isoferulic acid isomer 1/Ferulic acid ^c	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,04930	8,05	50,1	58,7		18794.9523 (56.66); 11532.4112 (34.76)	-6,86	99,57
Isoferulic acid isomer 2/Ferulic acid ^c	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,04953	8,28	47,2	47,2		1395.3448 (27.18); 5133.6652 (100)	-5,66	95,11
Eriocitrin isomer 1 ^c	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	595,16571	7,96	39,1	8,83		5418.9168 (4.64); 116882.7289 (100); 4379.8727 (3.75)	-1,90	88,89
Eriocitrin isomer 2 ^c	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	595,16520	8,25	39,1	10,3		41810.5513 (4.69); 4476.2860 (1.04); 4660.6935 (1.08)	-2,76	88,46
p-coumaric acid glucoside ^b	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,09112	8,17	43,3	39,2		2323.5114 (26.75); 7659.1480 (88.16); 1007.2778 (11.59)	-5,43	83,31
3-[2-(carboxymethyl)-3,4-dihydroxy-phenyl]prop-2-enoic acid ^b	C ₁₁ H ₁₀ O ₆	237,03939	8,25	39,4	8,02		41810.5513 (9.69); 70545.7801 (16.35)	-4,52	94,38
Sinapic acid ^b	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223,05976	8,14	39	8		2323.5114 (12.45); 4052.6180 (21.72)	-6,42	94,42
Dihydroferulic acid isomer 1 ^c	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195,06497	8,27	55,5	89,8		1395.3448 (3.34); 2365.8236 (5.66); 41810.5513 (100); 1359.5849 (3.25); 38227.1271 (91.43); 3810.2347 (9.11)	-6,68	95,03
Dihydroferulic acid isomer 2 ^c	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195,06494	8,73	42,4	27,9		6475.8304 (100)	-6,83	91,62
2-O-Cinnamoyl-beta-D-glucopyranose ^b	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309,09983	10,12	36,3	1,1		3824.6864 (4.69)	5,99	87,49

Ethyl caffeate ^b	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207,06519	10,34	57,6	95,1	1830.6759 (41.19); 4444.7688 (100); 2842.9807 (63.96)	-5,24	98,98	
Flavonoids									
Gallocatechin/Epigallocatechin ^c	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,06438	3,85	54,7	97,8	5080.797 (100); 1646.9082 (32.41)	-7,51	84,36	
Epicatechin isomer 1 ^c	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07058	5,94	43,2	25,1	3724.8697 (7.35); 13534.1288 (26.72); 9672.0223 (19.09); 11742.6862 (23.18); 3453.7157 (6.82)	-4,09	95,54	
Epicatechin ^a	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07062	6,92	41,9	18,1	1803.6892 (13.85); 4110.1533 (31.55); 13026.6712 (100); 12529.2822 (96.18); 2276.0476 (17.47); 5691.0017 (43.69); 1696.6462 (13.02); 869.9689 (6.68); 440.2411 (3.38)	-3,95	95,86	
Luteolin 7-rutinoside isomer 1 ^c	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,14940	7,37	41,1	24,2	6690.9533 (20.43); 4356.3939 (13.30); 6903.5868 (21.08)	-3,01	84,76	
Luteolin 7-rutinoside isomer 2 ^c	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,14940	8,55	41,1	21,2	2151.183 (24.77); 8685.9393 (100); 4181.1701 (48.14)	-3,02	87,89	
Apigenin-7-apioglucoside isomer 1 ^c	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,13898	7,32	39,4	18,6	2471.1819 (4.24); 16979.9954 (29.16); 58238.6230 (100); 3877.5287 (6.66)	-2,93	81,98	
Apigenin-7-apioglucoside isomer 2 ^c	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563,13948	7,50	36,2	1,26	4291.6463 (5.45); 1184.7973 (1.50); 40638.5539 (51.60)	-2,04	82,34	
Quercetin 3-rutinoside ^b	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,14454	8,09	37,8	10	2798.0452 (27.26); 3224.4301 (31.41); 5689.0572 (55.42)	-2,57	82,19	
Isotectorigenin/Tectorigenin/3'- Hydroxymelanettin/Koparin/Hispidulin ^c	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299,05823	8,12	37,8	11,5	4052.618 (21.72); 1245.0573 (6.67)	7,05	85,48	
Pinoembrin/Isoliquiritigenin/ Dihydrodazein ^c	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255,06879	8,67	37,3	12,8	17484.1875 (19.52)	9,78	84,17	
Isoquercetin ^a	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,08695	8,30	42,3	19,1	1709.5867 (2.99); 1713.0235 (3.00); 6158.3176 (10.77); 9988.5801 (17.48); 24479.5217 (42.83)	-2,68	95,52	
Quercetin 3-O-alpha-L-fucopyranoside ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,09208	8,77	47,6	50,1	3591.8234 (9.46); 2790.9323 (7.35); 8263.4830 (21.76); 6672.1664 (17.57); 4428.4443 (11.66)	-2,69	91,05	
Gardenin B ^b	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	357,09676	9,98	37,8	1,41	9035.2264 (47.83); 808.8191 (4.28)	-3,39	91,77	
Quercetin/6-Hydroxyluteolin/Morin ^c	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,03422	10,23	40,3	10,2	3050.13 (15.32); 11458.94 (57.57); 2242.74 (12.27); 5903.43 (29.66)	-3,84	95,60	
Hesperetin/Homoeriodictyol ^b	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301,07050	10,26	39,4	9,14	6959.0174 (100)	-4,19	92,93	
4'-Methyl-epigallocatechin ^b	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	319,08093	10,89	37,1	1,67	505.1512 (1.04); 496.7625 (1.02)	-4,36	88,69	
3'-Hydroxydaidzein/	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,04427	10,96	36,7	1,18	124.8971 (2.92)	-4,74	87,70	

8-Hydroxydaidzein/Genistein/Baicalein/Galangin/
6-Hydroxydaidzein/3',4',7-Trihydroxyflavone/Apigenin^c

3,7-Dimethylquercetin ^b	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329,06546	11,07	48,5	51,2	656.5989 (2.73); 7331.2462 (30.51); 598.4731 (2.49); 3558.3534 (14.81); 13066.9312 (54.38); 13917.8200 (57.92); 20678.8007 (86.06)	-3,69	95,62	
Kaempferol ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,03923	11,08	55,3	85	656.5989 (5.02); 147.9931 (1.13); 598.4731 (4.58); 3558.3534 (27.23); 9268.0201 (70.93); 13066.9312 (100)	-4,30	96,77	
Xanthohumol/Isoxanthohumol ^b	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	353,13829	11,89	49,6	55,4	78872.7107 (100); 3574.0002 (4.53); 20038.6600 (25.41); 9435.4533 (11.96)	-3,26	96,35	
Other polyphenols									
Pyrogallol ^a	C ₆ H ₆ O ₃	125,02340	1,82	37,9	0	nd	-8,06	98,34	
Phlorin ^b	C ₁₂ H ₁₆ O ₈	287,07589	3,85	55,7	97,6	5080.797 (100)	-4,68	86,06	
Esculetin ^b	C ₉ H ₆ O ₄	177,01824	6,16	41,9	19,2	1559.5396 (3.77); 1949.6055 (4.71)	-6,14	97,29	
4-hydroxybenzaldehyde ^b	C ₇ H ₆ O ₂	121,02851	6,19	40,1	10,8	3641.0631 (17.15); 11113.1409 (52.35)	-8,14	98,65	
Phenylacetic acid isomer 1 ^c	C ₈ H ₈ O ₂	135,04398	6,30	39,4	9,11	301.8487 (1.03); 29357.2953 (100)	-8,61	97,55	
Phenylacetic acid isomer 2 ^c	C ₈ H ₈ O ₂	135,04417	7,12	42,7	29,3	2146.294 (10.26); 3582.4290 (17.13); 13887.3966 (66.42)	-7,20	92,13	
Oleoside dimethylester ^b	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₁	417,13896	9,14	42,5	23,2	38109.1439 (100)	-3,04	93,05	
Scopoletin ^b	C ₁₀ H ₈ O ₄	191,03384	9,52	44,5	33,3	94478.9718 (100)	-5,95	96,22	
Lignan									
Sesamol ^b	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	371,11189	9,93	36	4,5	337.0489 (15.97)	-4,67	80,92	

*Os compostos foram identificados em nível de acordo com a Metabolomics Standards Initiative, onde a, b e c correspondem respectivamente aos níveis I (compostos identificados), II (compostos supostamente anotados, por exemplo, sem padrões de referência química, com base em propriedades físico-químicas e / ou similaridade espectral com bibliotecas espectrais públicas / comerciais) e III (classes de compostos caracterizados putativamente, por exemplo, com base nas propriedades físico-químicas características de uma classe química de compostos, ou por semelhança espectral com compostos conhecidos de uma classe química). m/z: massa carga. RT: Tempo de retenção. FS: Score de fragmentação. IS: Similaridade isotópica. nd: não determinado

3.2 Análises multivariadas para identificação do perfil de fenólicos das amostras de cervejas

Para melhor compreensão da variabilidade de compostos fenólicos entre as amostras foi aplicada a análise de componentes principais (PCA biplot), onde foram distribuídas as amostras e os compostos identificados.

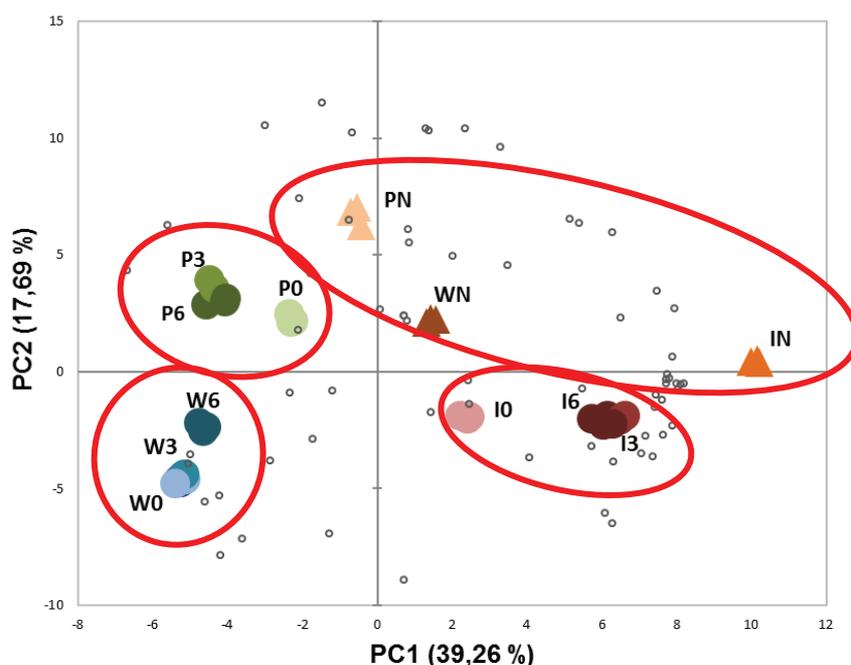


Figura 6: Análises de componentes principais (PCA biplot) para todas as amostras de cerveja de acordo com o estilo.

Os valores de PC1 e PC2 para todas as amostras (Figura 6) podem explicar 56,95% da variância entre os estilos e marcas das cervejas analisadas. Os estilos Pilsen, Witbier e IPA, apresentaram perfis e abundâncias diferentes de compostos assim como as duas marcas tiveram baixa similaridade. Em PC1 destacam-se os estilos Witbier e IPA e em PC2 o estilo Pilsen das amostras produzidas pela mesma cervejaria e analisadas em diferentes tempos de armazenamento. E PC1 e PC2 separam as duas marcas, evidenciando diferenças entre elas

A amostra P0, analisada logo após a produção, apresentou maior número de compostos identificados, o que pode caracterizar essa variabilidade. Compostos como: ácido m-cumárico isômero, isoquercetina e ácido 3-O-metilgálico foram identificados somente nesta amostra. A

amostra PN é produzida por outra cervejaria que, provavelmente, utiliza diferentes ingredientes, além disso, foram identificados mais compostos do que na P3.

Nas amostras do estilo Witbier, a W6 obteve maior variabilidade devido à abundância relativa mais elevada de alguns compostos como o ácido gálico e 4-hidroxibenzaldeído. Para o estilo IPA, a amostra I0 foi a que apresentou menor abundância relativa comparada a I3 e I6 para alguns compostos como 4-hidroxibenzaldeído e xanthohumol, e o ácido dihidroferúlico isômero 2 foi identificado somente nas amostras I3 e I6. As amostras da cervejaria N apresentaram elevada variabilidade em relação as outras.

A análise hierárquica de cluster e o mapa de calor foram realizados para investigar o grau de semelhança ou variabilidade entre os compostos fenólicos relativamente identificados nas amostras.

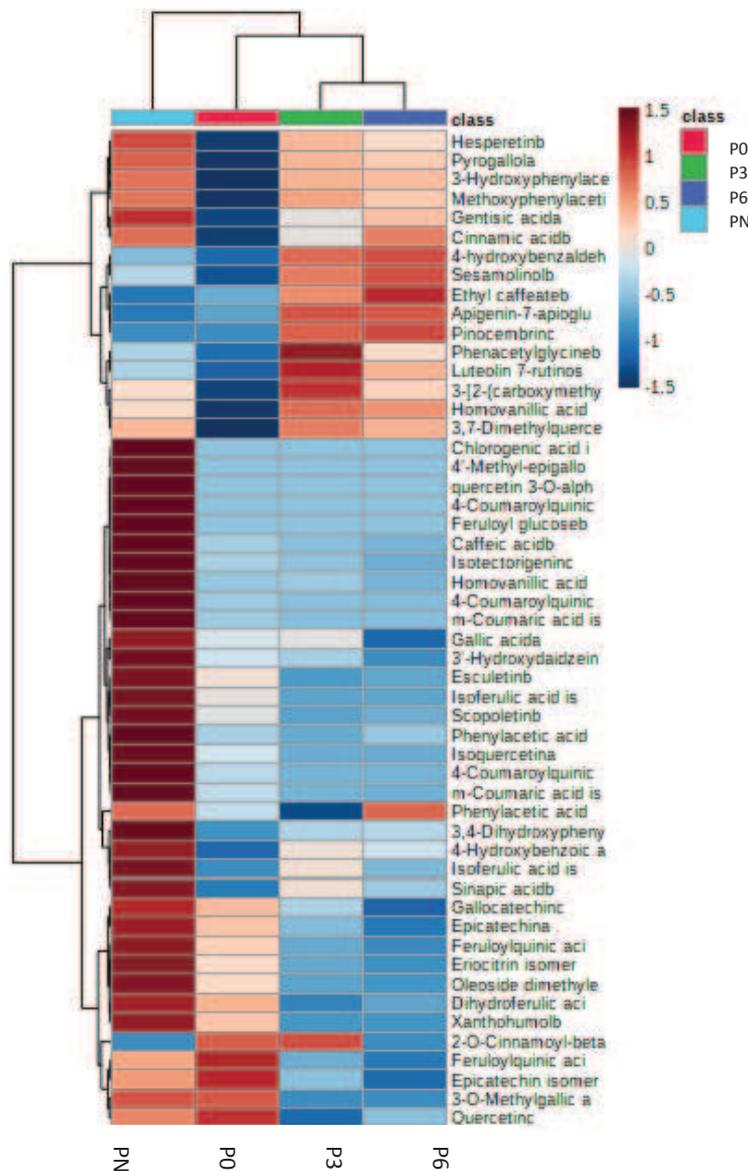


Figura 7. Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo Pilsen

No mapa de calor é possível identificar a abundância dos compostos em cada uma das amostras. Para o estilo Pilsen (Figura 7), a amostra PN se destacou, pois apresentou maior abundância em compostos opostos aos encontrados em P0, P3 e P6, como o ácido gálico e cafeico, que são compostos fenólicos comumente encontrados em cervejas, com o ácido gálico em maior abundância em cervejas do tipo Lager (Quifer-Rada et al., 2015). A amostra P0 apresentou um perfil de compostos diferenciado em relação a P3 e P6, são amostras produzidas pela mesma cervejaria e analisadas em tempos de armazenamento diferentes, o que pode ter influenciado a composição de fenólicos. Compostos como epicatequina e galocatequina podem ser degradados ao longo do tempo em bebidas mantidas a 25°C, caso ocorra elevação na temperatura de conservação estes compostos podem sofrer mudanças químicas como epimerização, hidrólise, oxidação e polimerização, além disso estas reações podem provocar a formação de outros compostos (Li et al., 2010; Ananingshi et al., 2013). Epicatequina e galocatequina foram identificados em P0 e não encontrados em P3 e P6.

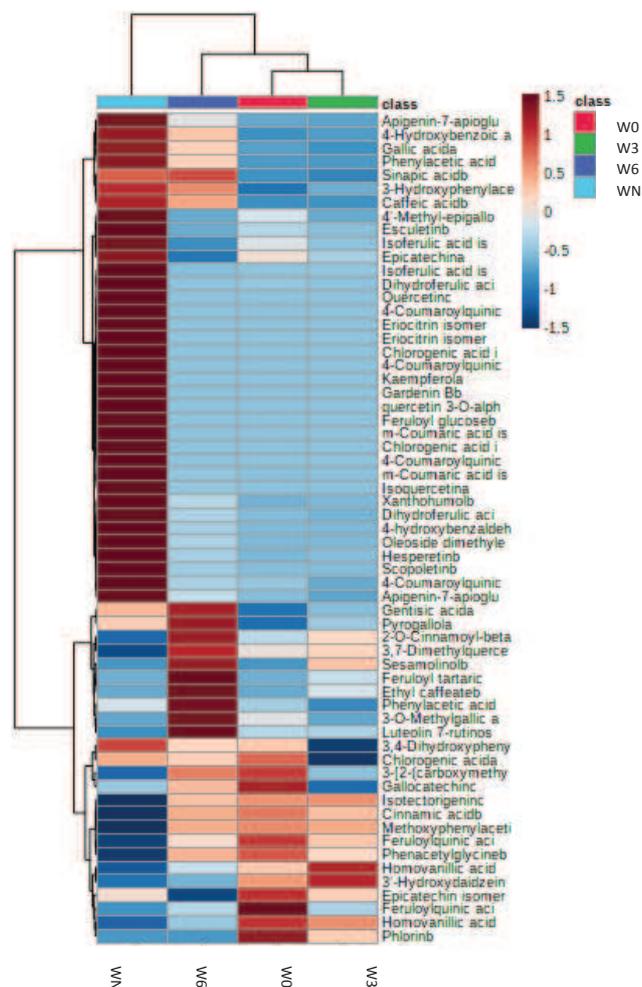


Figura 8. Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo Witbier

No mapa de calor do estilo Witbier (Figura 4), a amostra WN apresentou maior abundância em compostos específicos como a gardenina B, um composto encontrado em frutas cítricas, entre as amostras W0, W3 e W6 ocorreram variabilidades durante o armazenamento, alguns compostos foram mais abundantes em W6 do que em W0 e W3. De acordo com Zhao et al., (2015), a concentração de alguns compostos fenólicos durante o armazenamento pode reduzir após três meses, se manter estável ou aumentar.

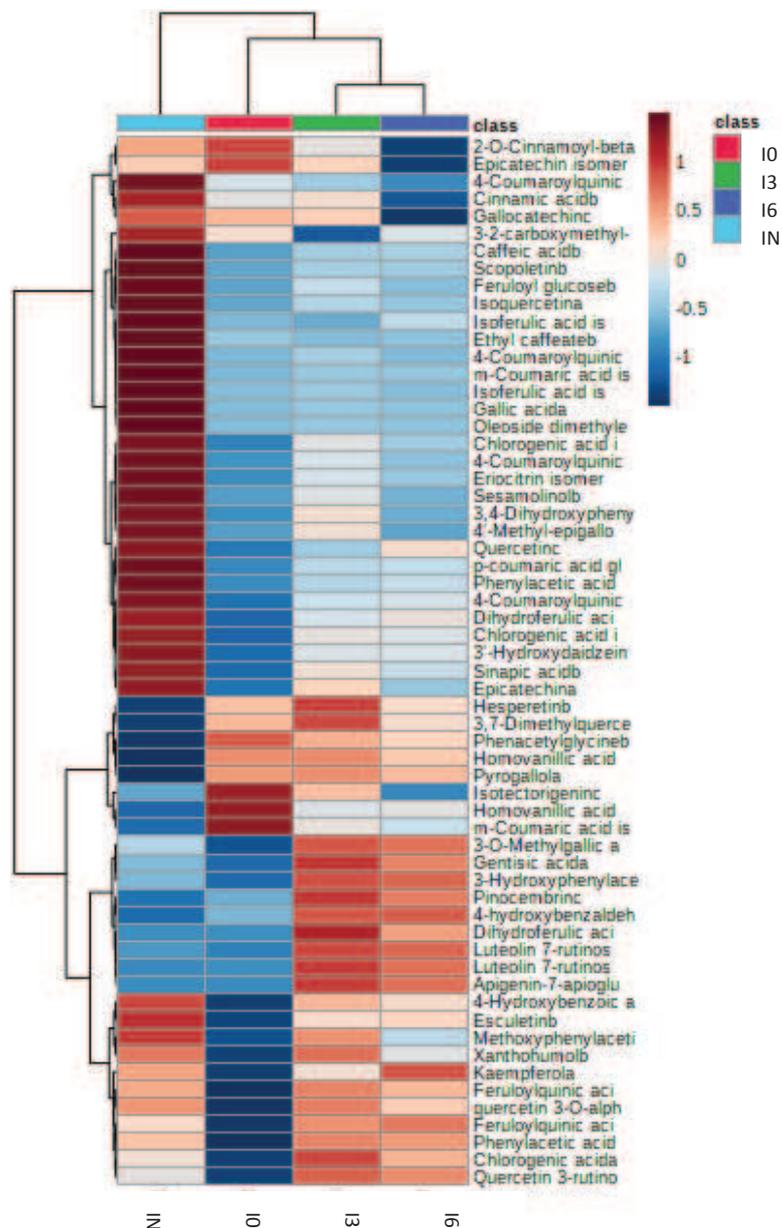


Figura 9. Análise de cluster e mapa de calor das amostras do estilo IPA

No estilo IPA (Figura 9) a amostra IN se destaca com maior intensidade em determinados compostos, I0 apresentou um perfil diferenciado em relação a I3 e I6 que tiveram semelhanças. Destaque para o composto xanthohumol, geralmente encontrado em maior abundância em cervejas mais amargas, é possível verificar que ocorreu redução no período de três a seis meses de armazenamento, onde pode ter ocorrido a degradação das moléculas de iso alfa ácidos do lúpulo e destes compostos (Caballero et al., 2012).

Não foram encontradas na literatura informações específicas sobre o comportamento do perfil de compostos fenólicos durante o armazenamento da cerveja na garrafa. Entretanto, estudos que analisaram compostos fenólicos em vinhos, observaram que ao longo do tempo pode ocorrer diminuição na concentração de catequinas e epicatequinas, o ácido gálico apresentou comportamento instável, podendo elevar ou reduzir, os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico aumentaram. Estes estudos atribuíram essas alterações a reações de polimerização e despolimerização que podem ocorrer ao longo do tempo (Kallithraka et al., 2009; Marquez et al., 2014).

A análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais, foi realizada para caracterizar as semelhanças e diferenças entre o perfil de compostos fenólicos dos três estilos de cerveja. Foram correlacionadas as médias das amostras (0, 3 e 6) de cada estilo. Os gráficos S-plot mostram a distância entre as variáveis e a contribuição dos compostos fenólicos em quadrantes opostos para diferenciar as amostras.

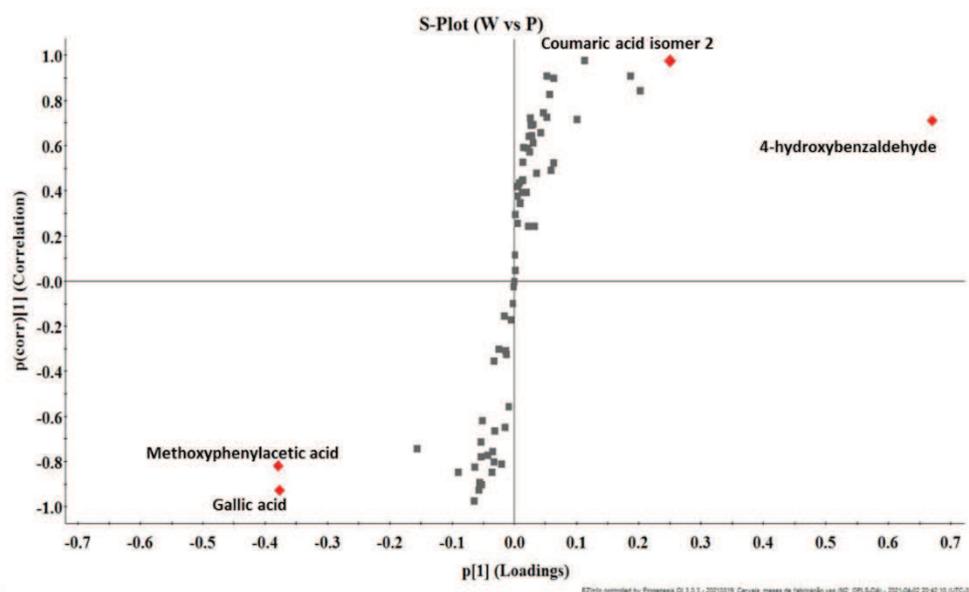


Figura 10: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo Witbier e Pilsen

A Figura 10 apresenta um total de quatro compostos que contribuíram para a diferenciação entre as amostras do estilo Witbier e Pilsen. O ácido gálico e metoxifenilacético foram mais abundantes nas amostras Witbier e o ácido cumárico isômero 2 e o 4-hidroxibenzaldeído mais abundantes na Pilsen.

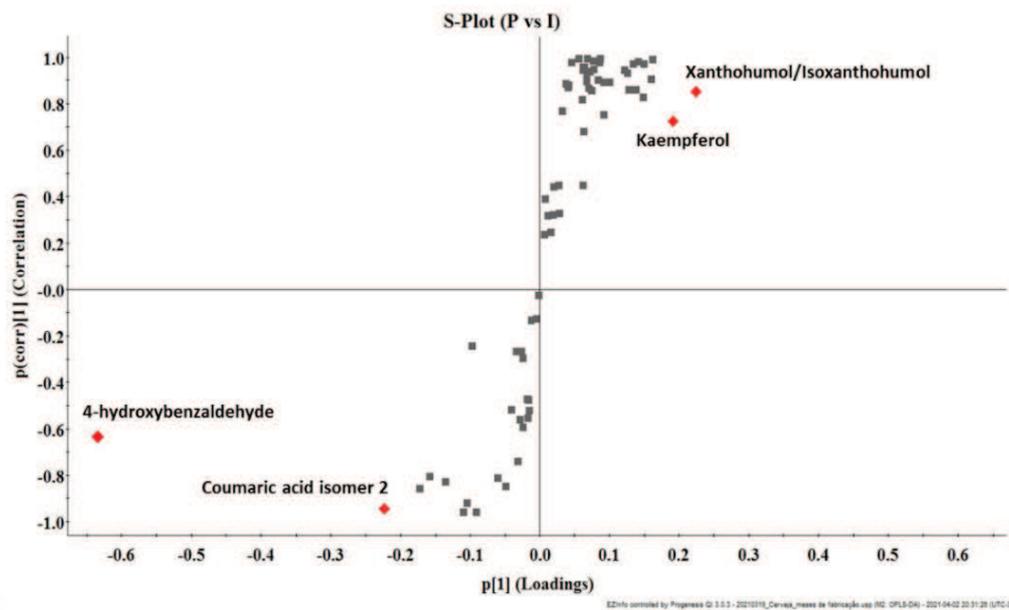


Figura 11: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo Pilsen e IPA

A correlação entre as amostras Pilsen e IPA (Figura 11), destacaram-se os compostos xanthohumol/ isoxanthohumol e kaempferol para o estilo IPA, compostos naturalmente encontrados no lúpulo (Callemien & Collin, 2009).

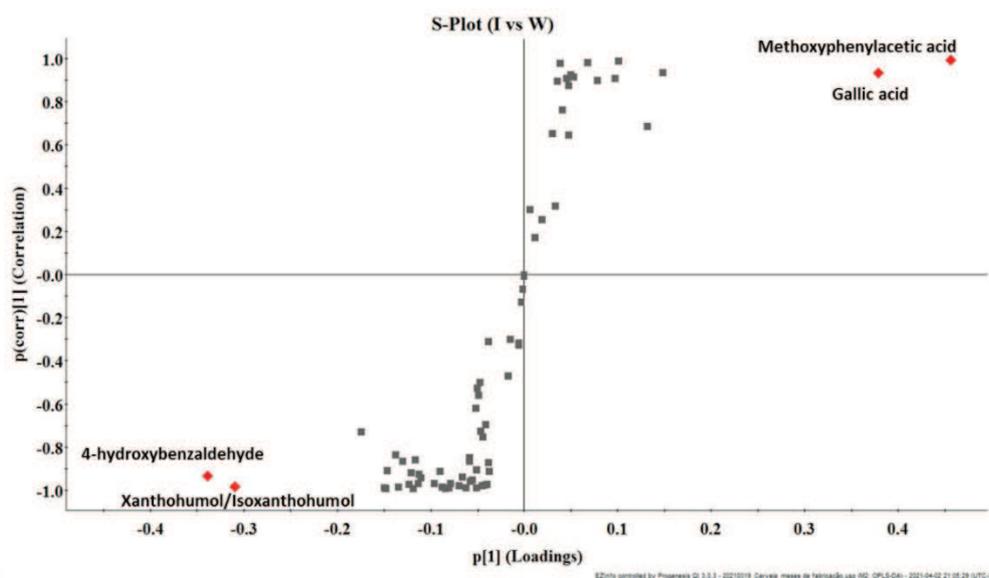


Figura 12: S-plot do perfil metabólico das cervejas do estilo IPA e Witbier

Entre as amostras IPA e Witbier (Figura 12) a diferenciação ocorreu pelos compostos 4-hidroxibenzaldeído e xanthohumol/isoxanthohumol para a IPA e ácidos metoxifenilacético e gálico para Witbier.

4. Considerações Finais

A cerveja apresenta diversos compostos fenólicos, o número de identificações e a abundância relativa para cada amostra apresentou elevada variabilidade. Para as amostras analisadas durante o armazenamento, o comportamento dos compostos foi diferenciado para cada estilo, a concentração de alguns reduziu, aumentou ou manteve-se estável. São necessários mais estudos para melhor compreensão das reações químicas que ocorrem durante o armazenamento e influenciam no perfil e na concentração dos compostos fenólicos da cerveja. O estilo IPA obteve o maior número de compostos e cervejas do mesmo estilo produzidas por diferentes cervejarias possuem composição de fenólicos variada o que está relacionado aos ingredientes e processo de produção.

CONCLUSÃO GERAL

A caracterização físico-química das amostras permitiu observar que durante o armazenamento na garrafa, reações de oxidação, degradação de compostos fenólicos e formação de produtos da reação de Maillard, podem provocar o escurecimento da cerveja. O amargor, característica relacionada aos iso-alfa-ácidos presentes no lúpulo, também pode sofrer alterações ao longo do tempo. O teor de carboidratos reduziu após três meses e as amostras Witbier e IPA apresentaram maior quantidade de açúcares, o que pode estar relacionado à fermentação do tipo Ale. O teor de proteínas manteve-se relativamente estável, a pasteurização pode desnaturar enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas.

O teor de fenólicos totais não apresentou variações significativas durante o armazenamento para os estilos Pilsen e Witbier e na IPA ocorreu redução. Estudos verificaram que cervejas do tipo Ale e de coloração escura podem apresentar maior teor de compostos fenólicos, características encontradas na IPA, que obteve o maior teor entre os estilos. E na composição do estilo IPA são adicionadas maiores quantidades de lúpulo, ingrediente com elevado teor de compostos fenólicos, que podem ser degradados durante o armazenamento.

Os valores de atividade antioxidante variaram para cada método realizado e no ensaio de ORAC foram mais elevados devido a sensibilidade do método. Durante o armazenamento foram observados comportamentos distintos entre os estilos. A capacidade antioxidante foi mais elevada no estilo IPA, fatores como tipo de fermentação, composição de maltes e teor alcoólico podem influenciar. Para o estilo IPA houve correlação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos e para Pilsen e Witbier foram observadas correlações positivas entre a atividade antioxidante e amargor.

Entre os estilos ocorreram variabilidades no perfil de compostos, na abundância relativa e no número de identificações. Para os estilos IPA e Witbier foram identificados compostos exclusivos. Não foi possível esclarecer exatamente as alterações de comportamento nas concentrações dos compostos fenólicos durante o armazenamento, alguns mantiveram-se estáveis, reduziram ou elevaram. Acredita-se que reações de polimerização e despolimerização podem ocorrer ao longo do tempo.

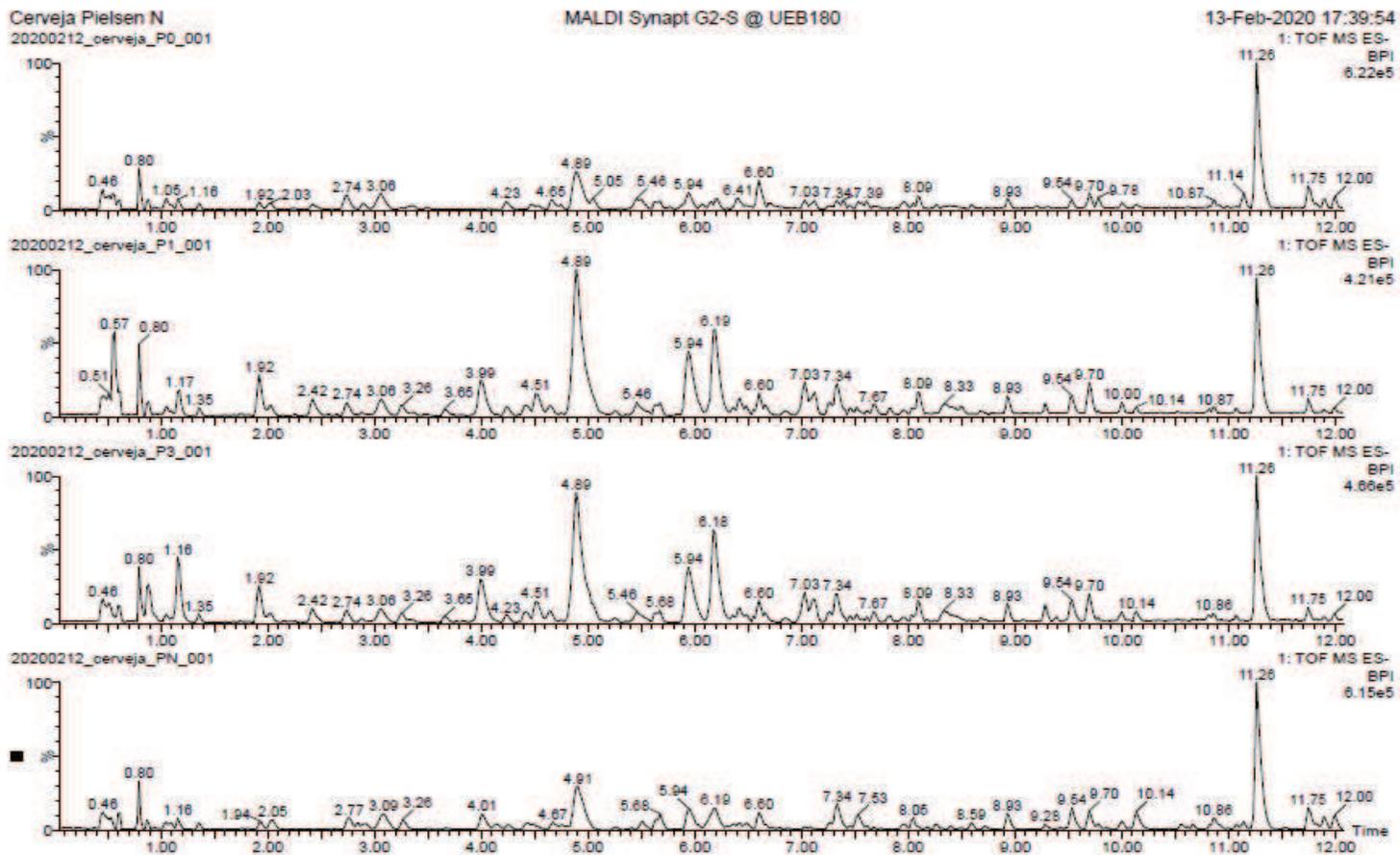
A comparação dos resultados das análises entre as diferentes marcas de cerveja analisadas, mostrou que os tipos de ingredientes, como os maltes e lúpulos, devido as variações genéticas e de cultivar e o modo de produção podem influenciar a composição e as características químicas da bebida.

O estilo IPA foi o que apresentou mais alterações durante o armazenamento, apresentou os maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, além de maior número de compostos identificados e exclusivos.

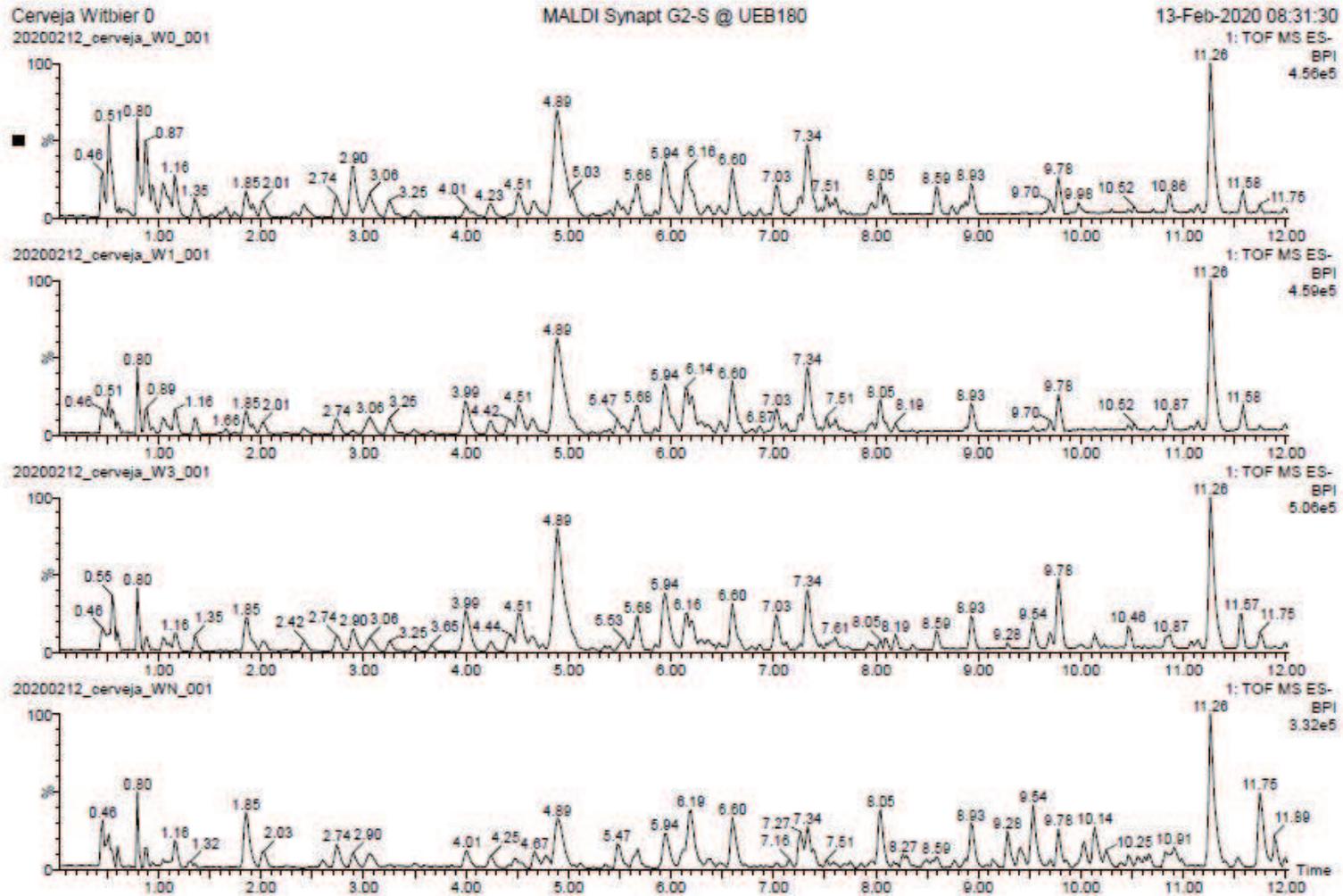
A cerveja apresenta variados compostos fenólicos e seu consumo moderado pode oferecer benefícios para a saúde. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão das transformações que ocorrem nestes compostos, principalmente durante o armazenamento na garrafa, ao longo do tempo.

ANEXOS

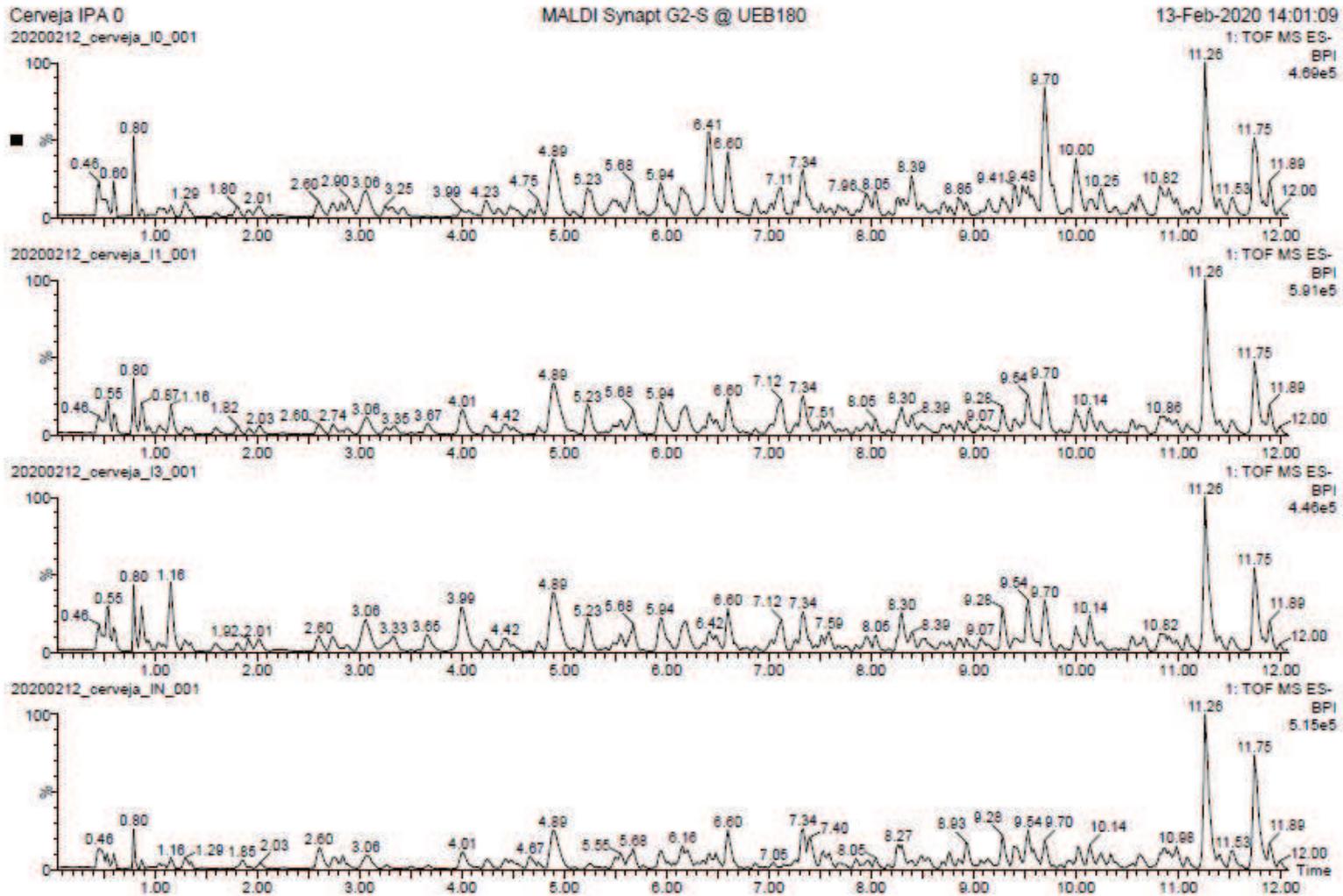
1. Cromatogramas amostras Pilsen



2. Cromatogramas amostras Witbier



3. Cromatogramas amostras IPA



Referências Bibliográficas

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review: Humulus lupulus - a story that begs to be told. *Journal of the Institute of Brewing*.
- Ananingsih VK, Sharma A and Zhou WB, Green tea catechins during food processing and storage: a review on stability and detection. *Food Research International* 50:469–479 (2013).
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 66(1), 01–09.
- Bamforth, Ch. W. (2002). Nutritional aspects of beer – A review. *Nutrition Research*, 22, 227–237.
- Beer. Britannica Academic, Encyclopædia Britannica, Disponível em: <https://academic-eb-britannica.ez39.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/beer/106004>. Acesso em: 26 out. 2018.
- Bertuzzi, T., Mulazzi, A., Rastelli, S., Donadini, G., Rossi, F., & Spigno, G. (2020). Targeted healthy compounds in small and large-scale brewed beers. *Food Chemistry*, 310, 125935.
- Bettenhausen, H. M., Barr, L., Broeckling, C. D., Chaparro, J. M., Holbrook, C., Sedin, D., & Heuberger, A. L. (2018). Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. *Food Research International*, 113, 487–504.
- Bezerra, F. de S., da Costa, D. F., & Koblitz, M. G. B. (2020). Integral use of oil-based raw materials with “green solvents”: review and opportunities. *Research, Society and Development*, 9(8), e372985388.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. <https://doi.org/10.1201/9780203024195>
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porras, M. (2012). Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science & Technology*, 26(1), 21–30.
- Callemien, D., & Collin, S. (2007). Involvement of Flavanoids in Beer Color Instability during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9066–9073.
- Callemien, D., & Collin, S. (2009). Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer—A Review. *Food Reviews International*, 26(1), 1–84.

- Carvalho, N. B., Minim, L. A., Nascimento, M., Ferreira, G. H. C., Minim, V. P. R., (2018) Characterization of the consumer market and motivations for the consumption of craft beer, *British Food Journal*, Vol. 120 Issue: 2, pp.378-391.
- CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/ Acesso em 20/03/2021 às 10:00.
- Cheiran, K. P., Raimundo, V. P., Manfroi, V., Anzanello, M. J., Kahmann, A., Rodrigues, E., & Frazzon, J. (2019). Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 286, 113–122.
- Cimini, A., & Moresi, M. (2018). Combined enzymatic and crossflow microfiltration process to assure the colloidal stability of beer. *LWT*, 90, 132–137.
- Cho, J.-H., Kim, I.-D., Dhungana, S. K., Do, H.-M., & Shin, D.-H. (2018). Persimmon fruit enhanced quality characteristics and antioxidant potential of beer. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 1067–1073.
- Ciriminna, R., Albanese, L., Di Stefano, V., Delisi, R., Avellone, G., Meneguzzo, F., & Pagliaro, M. (2018). Beer produced via hydrodynamic cavitation retains higher amounts of xanthohumol and other hops prenylflavonoids. *LWT*, 91, 160–167.
- Donadini, G., & Porretta, S. (2017). Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Research International*, 91, 183–198.
- Ducruet, J., Rébenaque, P., Diserens, S., Kosińska-Cagnazzo, A., Héritier, I., & Andlauer, W. (2017). Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food Chemistry*, 226, 109–118.
- Elrod, S. M. (2018). Xanthohumol and the Medicinal Benefits of Beer. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (p. 19–32). Elsevier.
- Granato, D., Branco, G. F., Faria, J. de A. F., & Cruz, A. G. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 563–571.
- Grochalová, M., Konečná, H., Stejskal, K., Potěšil, D., Fridrichová, D., Srbová, E., Ornerová, K., & Zdráhal, Z. (2017). Deep coverage of the beer proteome. *Journal of Proteomics*, 162, 119–124.
- Habschied, K., Lončarić, A., & Mastanjević, K. (2020). Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. *Foods*, 9(2), 238.
- Han, H., Kim, J., Choi, E., Ahn, H., & Kim, W. J. (2016). Characteristics of beer produced from Korean six-row barley with the addition of adjuncts: Characteristics of beer produced from Korean six-row barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(3), 500–507.

- Heuberger, A. L., Broeckling, C. D., Lewis, M. R., Salazar, L., Bouckaert, P., & Prenni, J. E. (2012). Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. *Food Chemistry*, *135*(3), 1284–1289.
- Hornsey, Ian S. A History of Beer and Brewing. (2003). *Cambridge*: Royal Society of Chemistry.
- Humia, B. V., Santos, K. S., Schneider, J. K., Leal, I. L., de Abreu Barreto, G., Batista, T., Machado, B. A. S., Druzian, J. I., Krause, L. C., da Costa Mendonça, M., & Padilha, F. F. (2020). Physicochemical and sensory profile of Beauregard sweet potato beer. *Food Chemistry*, *312*, 126087.
- Jin, B., Li, L., Feng, Z.-C., Li, B., Liu, G.-Q., & Zhu, Y.-K. (2012). Investigation of the relationship of malt protein and beer haze by proteome analysis: proteomic study of malt protein and beer haze. *Journal of Food Processing and Preservation*, *36*(2), 169–175.
- Kallithraka, S., Salacha, M.I., Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, *113* (2), 500-505.
- Koren, D., Kun, S., Hegyesné Vecseri, B., & Kun-Farkas, G. (2019). Study of antioxidant activity during the malting and brewing process. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(8), 3801–3809.
- Koren, D., Hegyesné Vecseri, B., Kun-Farkas, G., Urbin, Á., Nyitrai, Á., & Sipos, L. (2020). How to objectively determine the color of beer? *Journal of Food Science and Technology*, *57*(3), 1183–1189.
- Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Taidi, B., & Ennahar, S. (2011). Effects of Processing Steps on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(4), 1249–1255.
- Li, H., Zhao, M., Cui, C., Sun, W., & Zhao, H. (2016). Antioxidant activity and typical ageing compounds: Their evolutions and relationships during the storage of lager beers. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(9), 2026–2033.
- Lin X, Zhang L, Lei H, Zhang H, Cheng Y, Zhu R et al., Effect of drying technologies on quality of green tea. *International Agricultural Engineering Journal*, 19:30–37 (2010).
- Louche, L. M.-M., Luro, F., Gaydou, E. M., & Lesage, J.-C. (2000). Phlorin Screening in Various Citrus Species and Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(10), 4728–4733.
- Lund, M. N., Hoff, S., Berner, T. S., Lametsch, R., & Andersen, M. L. (2012). Effect of Pasteurization on the Protein Composition and Oxidative Stability of Beer during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(50), 12362–12370.
- Machado, J. C., Faria, M. A., Melo, A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Antiproliferative effect of beer and hop compounds against human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, *36*, 255–261.

- Maia, I. C., D'Almeida, C.T.S, Freire, D.G., M., Cavalcanti, E.D.A C., Cameron, L. C., Dias, J. F., & Ferreira, M. S. L. (2020). Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *LWT*, 133, 110136.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2020). http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta_publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018/. Acesso em 20/03/2021 às 10:00.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2019). Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019. Estabelece padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria.
- Marques, D. R, Cassis, M. A., Quelhas, J. O. F., Bertozzi, J., Visentainer, J.V., Oliveira, C. C., & Antonio Monteiro, A. R.G. (2017). Characterization of craft beers and their bioactive compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1747–1752.
- Marquez, A., Serratosa, M.P., Merida, J., (2014). Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines, *Food Chemistry* 146, 507-514.
- Martínez, A., Vegara, S., Herranz-López, M., Martí, N., Valero, M., Micol, V., & Saura, D. (2017). Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer: Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 58–65.
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72.
- Mesquita, J. S., Ramos, J. P., Everton, G. O., Mouchrek Filho, V. E., & Coelho, S. C. (2020). Production and physicochemical evaluation of a pure malt craft beer with the addition of Extracts of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Research, Society and Development*, 9(8), e872986216
- Miyake, Y., Yamamoto, K., & Osawa, T. (1997). Isolation of Eriocitrin (Eriodictyol 7-rutinoside) from Lemon Fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and Its Antioxidative Activity. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 3(1), 84–89.
- Morado, R. (2017). *Larousse da Cerveja*. 1ª edição. São Paulo: Alaúde Editorial.
- Moura-Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D. da, de Aguiar, P. F., Monteiro, M., Perrone, D., & Torres, A. G. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 199, 105–113.

- Nardini, M., & Foddai, M. S. (2020). Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. *Molecules*, 25(11), 2466.
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2020). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, 305, 125437.
- Oliveira Neto, J. R., de Oliveira, T. S., Ghedini, P. C., Vaz, B. G., & Gil, E. de S. (2017). Antioxidant and vasodilatory activity of commercial beers. *Journal of Functional Foods*, 34, 130–138.
- Oliver, G. (2011). Craft brewing. Oxford, UK: The Oxford Companion to Beer, Oxford University Press.
- Pai, T. V., Sawant, S. Y., Ghatak, A. A., Chaturvedi, P. A., Gupte, A. M., & Desai, N. S. (2015). Characterization of Indian beers: Chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1414–1423.
- Pereira A.S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1
- Piazzon, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10677–10683.
- Picariello, G., Bonomi, F., Iametti, S., Rasmussen, P., Pepe, C., Lilla, S., & Ferranti, P. (2011). Proteomic and peptidomic characterisation of beer: Immunological and technological implications. *Food Chemistry*, 124(4), 1718–1726.
- Picariello, G., Mamone, G., Cutignano, A., Fontana, A., Zurlo, L., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Proteomics, Peptidomics, and Immunogenic Potential of Wheat Beer (Weissbier). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3579–3586.
- Picariello, G., Mamone, G., Nitride, C., & Ferranti, P. (2017). Proteomic Analysis of Beer. In *Proteomics in Food Science* (p. 383–403). Elsevier.
- Pires, J., Torres, P. B., Chow, F., & Santos, D. (2017). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*.
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 169, 336–343.
- Rahman, M. J., Liang, J., Eskin, N. A. M., Eck, P., & Thiyam-Holländer, U. (2020). Identification of hydroxycinnamic acid derivatives of selected canadian and foreign commercial beer extracts and determination of their antioxidant properties. *LWT*, 122, 109021.

- Rodrigues, J. A., Barros, A. S., Carvalho, B., Brandão, T., Gil, A. M., & Ferreira, A. C. S. (2011). Evaluation of beer deterioration by gas chromatography–mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. *Journal of Chromatography A*, 1218(7), 990–996.
- Santos, M. C. B, Lima, L. R. S, Nascimento, F. R, Nascimento, T.P., Cameron, L. C., & Ferreira, M. S. L. (2019). Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. *Food Research International*, 124, 118–128.
- Šedo, O., Márová, I., & Zdráhal, Z. (2012). Beer fingerprinting by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry. *Food Chemistry*, 135(2), 473–478.
- SINDCERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. <https://www.sindicerv.com.br/sector-em-numeros/>. Acesso em 14/04/2021 às 10:00.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152- 178.
- Strong, G.; England, K. Guide of Styles 2015 Beer Judge Certification Program (BJCP). 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org/stylecenter.php>. Acesso em 20/03/2021.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., Reily, M. D., Thaden, J. J., & Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211-221.
- Tafulo, P. A. R., Queirós, R. B., Delerue-Matos, C. M., & Sales, M. G. F. (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*, 43(6), 1702–1709.
- Torres, P., Santos, J., Chow, F., & Santos, D. (2017). Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. *Instituto de Biociências*, Universidade de São Paulo.
- Urrea-Victoria, V., Pires, J. S., Torres, P. B., Chow, F., & Santos, D. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências*, Universidade de São Paulo.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357–381.
- Wannenmacher, J., Cotterchio, C., Schlumberger, M., Reuber, V., Gastl, M., & Becker, T. (2019). Technological influence on sensory stability and antioxidant activity of beers measured by ORAC and FRAP. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6628–6637.

- Wannenmacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality: Phenolic substances in beer and brewing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 953–988.
- Wenwen, Y., Tao, K., Gidley, M. J., Fox, G. P., & Gilbert, R. G. (2019). Molecular brewing: Molecular structural effects involved in barley malting and mashing. *Carbohydrate Polymers*, 206, 583–592.
- Zhao, H. (2015). Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer. *In Processing and Impact on Active Components in Food* (p. 533–539). Elsevier.
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119(3), 1150–1158.
- Zhao, H., Li, H., Sun, G., Yang, B., & Zhao, M. (2013). Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers: Assessment of antioxidants of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 910–917.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.