

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA VERLY DE MIRANDA SABINO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE CERVEJAS ADICIONADAS DE MATÉRIAS-PRIMAS DA AMAZÔNIA

MANAUS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA VERLY DE MIRANDA SABINO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DE CERVEJAS ADICIONADAS DE MATÉRIAS-PRIMAS DA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada no
programa de Mestrado em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito
para obtenção do título de
mestre.

Orientador: Prof. Dr. BRUNO NICOLAU PAULINO

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S116c Sabino, Camila Verly de Miranda
Caracterização físico-química e estudo da atividade antioxidante de cervejas adicionadas de matérias-primas da amazônia / Camila Verly de Miranda Sabino . 2020
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Bruno Nicolau Paulino
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Cerveja. 2. atividade antioxidante. 3. ingredientes amazônicos.
4. quimiometria. I. Paulino, Bruno Nicolau. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RESUMO

Com o passar dos anos, cervejarias vêm investindo na incorporação de novos ingredientes que melhorem o sabor e características físicas da cerveja. Tendo em vista a biodiversidade amazônica, de frutos e plantas, como camu-camu, taperebá, puxuri, bacuri, jambú, cumaru, araçá-boi, pripioca, cupuaçu e açaí, que podem ser utilizados na fabricação de cervejas aumentando seus teores de bioativos. Portanto, foi realizada a determinação das características físico-químicas (pH, cor, teor de sólidos totais e açúcares) de 15 amostras de cervejas produzidas em Manaus e Pará, as quais continham ingredientes amazônicos. Foi feita a determinação do perfil químico das amostras (ESI-MS), assim como a avaliação da atividade antioxidante (DPPH, ABTS, Fenóis Totais e Flavonoides Totais) das mesmas. As amostras de cervejas analisadas apresentaram características físico-químicas bastante diferentes, contudo a faixa de pH 4,21 a 5,73 classificou as amostras como ácidas. Com a análise de cor, foi possível observar que estas variaram entre si, sendo ABT (taperebá) e ABPL (controle) as cervejas mais claras e ABA (açaí) e ABC (camu-camu) as mais escuras. A amostra ABB (bacuri) foi a que apresentou maior teor de açúcares totais com $15960,45 \pm 417,09 \mu\text{g/mL}$ e ABPL (controle) a amostra que apresentou menor teor de açúcares $3128,79 \pm 265,65 \mu\text{g/mL}$. Ao analisar a atividade antioxidante, a amostra ABC (camu-camu) apresentou altos teores de fenólicos totais ($308,80 \pm 2,84$) e flavonoides ($222,29 \pm 1,02$), contribuindo para maior atividade nos testes de DPPH e ABTS, $5,15 \pm 1,60 \text{ mmol/L eq. de trolox}$ e $12,66 \pm 0,13 \text{ mmol/L eq. de trolox}$, respectivamente. Em contrapartida, as amostras controle TBT ($2,25 \pm 0,31 \text{ eq. trolox}$) e TBWI ($0,10 \pm 0,04 \text{ eq. trolox}$) foram as que apresentaram menor atividade antioxidante nos ensaios de ABTS e DPPH, respectivamente. Foi feita a análise da composição química das amostras, seguindo com análise quimiométrica para determinação dos componentes principais. Observou-se a formação de 3 grupos, sendo o grupo 1, composto pela amostra BJB; grupo 2 representado pelas amostras ABP, ABA e ABC; e o 3 pelas demais amostras. Os íons m/z 345 e 359 deram origem ao grupo 1; os íons m/z 238, 377 e 210 deram origem ao grupo 2; e os íons m/z 361 e 347 deram origem ao grupo 3. Com a fragmentação dos íons obtidos foi possível observar fragmentos chave descritos anteriormente para iso-alfa-ácidos. Através do presente estudo foi possível observar que a adição de ingredientes amazônicos melhorou a atividade antioxidante das amostras analisadas. Pesquisas neste âmbito se mostram necessárias a fim de caracterizar melhor as propriedades biológicas deste tipo de bebida, assim como avaliar a incorporação de ingredientes ricos em bioativos, descritos na literatura.

Palavras-chave: Cerveja, atividade antioxidante, ingredientes amazônicos, quimiometria.

ABSTRACT

Over the years, breweries have been investing in the incorporation of new ingredients that improve the taste and physical characteristics of beer. In view of the Amazonian biodiversity, fruits and plants, such as camu-camu, taperebá, biribá, puxuri, bacuri, jambú, cumaru, araçá-boi, priprioca, cupuaçu and açai, can be used in the manufacture of beers increasing their levels of bioactive . The determination of the physical-chemical characteristics (pH, color, total solids and sugar content) of 15 beer samples produced in Manaus and Pará. The chemical profile of the samples (ESI-MS) was determined, as well as the evaluation of antioxidant activity (DPPH, ABTS, Total Phenols and Total Flavonoids). The beer samples analyzed showed quite different physical-chemical characteristics, however the pH range 4.21 to 5.73 classified the samples as acidic. With the color analysis, it was possible to observe that these varied among themselves, with ABT (taperebá) and ABPL (control) the lightest beers and ABA (açai) and ABC (camu-camu) the darkest. The ABB sample (bacuri) was the one with the highest total sugar content with $15960.45 \pm 417.09 \mu\text{g} / \text{mL}$ and ABPL (control) was the sample with the lowest sugar content $3128.79 \pm 265.65 \mu\text{g} / \text{mL}$. When analyzing the antioxidant activity, the ABC sample (camu-camu) showed high levels of total phenolics (222.29 ± 1.02) and flavonoids (308.80 ± 2.84), contributing to greater activity in the DPPH tests and ABTS, $5.15 \pm 1.60 \text{ mmol} / \text{L eq. trolox}$ and $12.66 \pm 0.13 \text{ mmol} / \text{L eq. trolox}$, respectively. In contrast, the TBT control samples ($2.25 \pm 0.31 \text{ eq. Trolox}$) and TBWI ($0.10 \pm 0.04 \text{ eq. Trolox}$) were the ones that showed less antioxidant activity in the ABTS and DPPH tests, respectively. The chemical composition of the samples was analyzed, followed by chemometric analysis to determine the main components. The formation of 3 groups was observed, being group 1, composed by the sample BJB; group 2 represented by the ABP, ABA and ABC samples; and 3 for the other samples. The ions m / z 345 and 359 gave rise to group 1; ions m / z 238, 377 and 210 gave rise to group 2; and ions m / z 361 and 347 gave rise to group 3. With the fragmentation of the ions obtained, it was possible to observe key fragments previously described for iso-alpha acids. Through this study it was possible to observe that the addition of Amazonian ingredients improved the antioxidant activity of the analyzed samples. Research in this area is necessary to better characterize the biological properties of this type of drink, as well as to evaluate the incorporation of ingredients rich in bioactive substances, described in the literature.

Keywords: beer; antioxidant activity; amazon ingredients, chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Maiores produtores de cerveja do continente americano e respectivas produções registrada no ano de 2017 (hl)	15
FIGURA 2- Grãos e Flocos de cevada	18
FIGURA 3- Grãos de trigo	20
FIGURA 4- Lúpulo e pellets de lúpulo	22
FIGURA 5- Levedura <i>S. cerevisiae</i>	23
FIGURA 6- Grãos de arroz.....	25
FIGURA 7- Espiga de milho.....	26
FIGURA 8- Grãos de sorgo	27
FIGURA 9- Fluxograma das etapas de produção de cervejas	30
FIGURA 10- Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados na cerveja (1) Xanthohumol (2) Ácido ferúlico (3) Ácido sinápico (4) ácido vanílico (5) Ácido caféico (6) Ácido- <i>p</i> -cumárico (7) Ácido 4-hidroxifenilacético (8) Ácido siríngico (9) 8-prenilnaringenina	33
FIGURA 11. Análise do perfil de açúcares das cervejas. A) Score plot PC 1, 2 e 3; B) Biplot PC 1, 2 e 3.....	54
FIGURA 12 – Análise do perfil de fenólicos das cervejas. A) Score plot PC 1, 2 , 3; B) Biplot PC 1, 2 ,3.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Principais grupos cervejeiros e suas respectivas porcentagens na produção mundial de cerveja	14
TABELA 2- Características físico-químicas das cervejas.....	51
TABELA 3- Análise de cor das cervejas através do sistema CIELAB.....	52
TABELA 4. Composição de açúcar ($\mu\text{g/mL}$) em diferentes cervejas	56
TABELA 5- Análise da atividade antioxidante das cervejas... ..	59

LISTA DE SIGLAS

ABTS 2,2'-azino-bis

ABU álcool por volume

Akt/eNOS - proteína quinase B/ óxido nítrico sintase

Ca² íon cálcio

CI50 concentração inibitória média

CIELAB Commission Internationale de l'Éclairage-CIE

CO2 dióxido de carbono

DMSO Dimetilsulfóxido

DPPH 2,2- difenil-1-picril-hidrazi

EBC European Brewery Convention

ESI-MS Electrospray ionization mass spectrometry

EUA Estados Unidos da América

GAE ácido gálico

H₂S Sulfeto de hidrogênio

H3PO4 ácido fosfórico

HCA Hierarchical Cluster Analysis

HDL high density lipoprotein

HPAEC-PAD High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection

HPLC High performance liquid chromatography

HS-SPME/GC-MS Headspace Solid Phase Microextraction - Gas Chromatographic coupled Mass Spectrometry

IBU International Bitterness Units

Mg²⁺ íon magnésio

MS/MS Espectrometria de Massas em Tandem

NaOH hidróxido de sódio

NF-κB factor nuclear kappa B

OMS Organização Mundial da Saúde

P450- citocromo P450

PBS phosphate buffered saline

PCA Principal Component Analysis

pH potencial hidrogeniônico

PLS Partial Least Squares

PLS-DA Partial least squares discriminat analysis

RSIN Reflexão especular de refletância

SPE solid phase extraction

TE trolox

TNF-α interferon α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Histórico.....	15
2.2 Matérias primas.....	16
2.2.1. Água	16
2.2.2 Malte	17
2.2.3 Lúpulo.....	20
2.2.4 Levedura	22
2.2.5 Adjuntos do malte.....	23
2.2.6 Enzimas	28
2.3 Etapas de produção	29
2.4 Propriedades biológicas da cerveja	31
2.4.1 Atividade antioxidante.....	31
2.4.2 Atividade na doença cardiovascular.....	34
2.4.3 Atividade anticarcinogênica	35
2.4.4 Atividade antidiabética.....	35
2.6 Compostos voláteis da cerveja.....	39
2.7 Análise quimiométrica em cervejas	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Amostragem	45
4.2 Determinação das características físico-químicas	45
4.2.1 Determinação do pH.....	45
4.2.2 Teor de sólidos solúveis	45
4.2.3 Caracterização do perfil de mono- e dissacarídeos por HPAEC-PAD (High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)	45
4.2.4 Análise da cor.....	46
4.3 Avaliação da capacidade antioxidante	47
4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH•	47
4.3.2 Atividade sequestrante do radical ABTS•	47

4.3.3 Fenóis Totais.....	47
4.3.4 Flavonoides totais.....	48
4.4 Análise do perfil químico por Espectrometria de Massas com ionização por <i>Electrospray</i> (ESI-MS)	48
4.4.1 Análise quimiométrica.....	49
4.5 Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Propriedades físico-químicas.....	50
5.2 Atividade antioxidante	59
5.3 Análise do perfil químico.....	63
6. CONCLUSÃO	67
7. CRONOGRAMA.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Dentro da indústria alimentícia, as bebidas possuem papel importante por representarem um dos produtos mais consumidos pelo homem. Podem ser classificadas como alcoólicas ou não alcoólicas, sendo estas primeiras subdivididas ainda em fermentadas ou destiladas. As bebidas fermentadas geralmente precisam de uma fonte principal de açúcar, para que leveduras possam atuar metabolizando-o em álcool e dióxido de carbono. Para uma bebida ser considerada alcoólica deve possuir de 0,55 a 76% ABV (álcool por volume). As principais bebidas alcoólicas fermentadas são vinho, cerveja, cidra de maçã, saquê e hidromel (MAKWANA; HATI, 2019).

A cerveja é uma bebida com amplo histórico de utilização pelo homem, onde evidências arqueológicas apontam que o início de seu consumo se deu por volta de 3000 a.C., entre os sumérios (LI; WANG; LIU, 2016). Desde a antiguidade até os tempos atuais, o princípio da produção desta bebida, a fermentação, se mantém o mesmo, sendo melhorada com o passar dos anos a tecnologia envolta no processo. Além disso, novos ingredientes vem sendo incorporados na fabricação de cervejas, corroborando com a diversidade dos estilos disponíveis no mercado (STEFANUTO et al., 2017).

Quando comparada a outras bebidas alcoólicas, a cerveja se destaca por sua alta complexidade de composição devido à presença de vários ácidos orgânicos, vitaminas oriundas do malte, proteínas, lúpulo, além de minerais e nutrientes como potássio, magnésio, cálcio, fósforo e sódio (POLAK; BARTOSZEK; STANIMIROVA, 2013). Esta é similar ao chopp, diferindo apenas pela adição da etapa de pasteurização antes do envase da bebida (BRASIL, 2009). A produção de cervejas demanda reações complexas, as quais dão origem a inúmeros compostos com atividade antioxidante. Variações na matéria-prima, levedo e tecnologia de fermentação, estão diretamente relacionadas com as espécies de compostos encontrados, assim como com suas concentrações (ZHAO, 2014).

Para a produção de cervejas, é necessária a presença de alguns componentes específicos, como água, lúpulo, levedura, além de uma fonte de carboidrato. O malte de cevada ou trigo são tradicionalmente recomendados pela legislação alemã, Reinheitsgebot (Lei da Pureza), pois são as fontes que mantém melhor a estabilidade da cerveja, evitando a adição de adjuvantes, o que caracteriza

as cervejas puro malte (CHEIRAN et al., 2019). Para o preparo do malte são necessárias etapas como germinação e queima. O cereal escolhido é posto para germinar artificialmente sob temperaturas controladas. Em seguida, esse malte é torrado, produzindo substâncias responsáveis pela coloração da cerveja. Após, o malte torrado é moído, misturado com água e mantido em temperaturas pré-estabelecidos, dando origem ao mosto rico em açúcares. Este é aquecido juntamente com o lúpulo e logo refrigerado, para inoculação das leveduras. O mosto fermentado sofre processo de maturação por alguns dias em baixas temperaturas, seguido de filtração e estabilização. Alterações específicas nestas etapas de produção são responsáveis pela grande variedade de cervejas existentes (WUNDERLICH; BACK, 2009).

Há dois principais tipos de cervejas mais consumidos, Ale e Lager. Elas diferem entre si pelo tipo de levedura utilizada, temperatura de fermentação e sabor. A cerveja Ale é fermentada em temperaturas mais altas (15 a 24°C) do que a Lager, e a levedura responsável pelo processo é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta possui superfície hidrofóbica, onde o CO₂ formado se adere, gerando espuma. A cerveja Ale tem mais compostos ésteres e produtos secundários, corroborando para seu sabor frutado. Esse tipo de cerveja possui diversos estilos, onde os mais famosos são: Brown ale, Pale ale e India pale ale (LI; WANG; LIU, 2016). A cerveja do tipo Lager, além de popular é a mais consumida, representando cerca de 90% das cervejas produzidas no mundo. O nome lager originou-se da palavra alemã *lagern que significa* “armazenar” (PAVSLER; BUIATTI, 2010). É caracterizada pela fermentação e armazenagem em baixas temperaturas (3 a 13°C) e são produzidas com cepas de *Saccharomyces calshbergensis*. Os estilos representantes deste tipo de cerveja são: Pilsen, European Amber Lager, Dark Lager e Bock (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003; LI; WANG; LIU, 2016).

O atual cenário comercial evidencia que as maiores nações produtoras de cerveja continuam sendo a China, os EUA, o Brasil, o México e a Alemanha, uma vez que esses cinco países são responsáveis por mais da metade de todo volume da produção mundial de cerveja. No ranking dos 40 principais grupos cervejeiros do mundo, a cervejaria brasileira Petropolis ocupa o décimo primeiro lugar (BARTH-HAAS GROUP, 2018), conforme apresentado na tabela 1. Mesmo com o crescente avanço do mercado cervejeiro, os consumidores estão diminuindo a aquisição de cervejas industriais, optando por sua versão artesanal, visando autenticidade de

sabor (ELROD, 2018; GÓMEZ-CORONA et al., 2016). Com base no aumento da procura, o número de produtores de cervejas artesanais tem aumentado mundialmente como forma de suprir a demanda por produtos diferenciados (CHEIRAN et al., 2019).

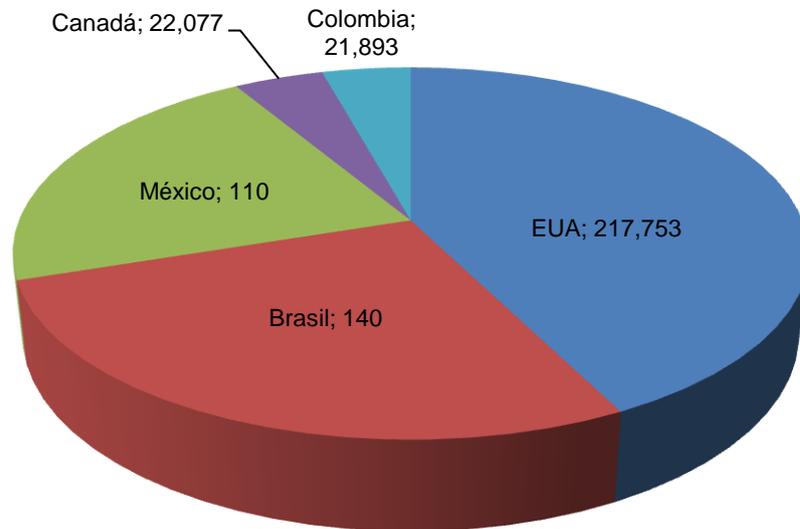
Tabela 1- Principais grupos cervejeiros e suas respectivas porcentagens na produção mundial de cerveja

Cervejarias	País	%
AB InBev	Bélgica	31.4
Heineken	Holanda	11.2
China Res. Snow Breweries	China	6.5
Carlsberg Denmark	Dinamarca	5.8
Molson-Coors	Canadá	5.1
Tsingtao Brewery Group	China	4.0
Asahi	Japão	3.0
Yanjing	China	2.2
BGI / Groupe Castel	França	2.0
Kirin	Japão	1.5
Petropolis	Brasil	1.3
Efes Group	Turquia	1.1
Constellation Brands	EUA	1.1
San Miguel Corporation	Filipinas	0.9
Saigon Beverage Corp. (SABECO)	Vietnã	0.9
Outras		22
Total		100

Fonte: Grupo Barth-Hass, 2018.

Quando observado apenas o continente americano, o Brasil ocupa o segundo lugar de destaque na produção mundial de cerveja. No ano de 2017, o Brasil produziu 140 hl de cerveja, ficando atrás apenas dos EUA que na mesma época teve o rendimento de 217,753 hl (BARTH-HAAS GROUP, 2018). A produção total de cerveja no continente americano está ilustrada na figura 1.

Figura 1- Maiores produtores de cerveja do continente americano e respectivas produções registradas no ano de 2017 (hl)



Fonte: Grupo Barth-Hass, 2018.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas desde a antiguidade. Historicamente, achados arqueológicos apontam que a prática cervejeira teve início na Mesopotâmia. Nesta região a cevada, principal grão utilizado na fabricação de cerveja, era amplamente cultivada. Os produtores de cervejas começaram a ser reconhecidos e considerados importantes, devido à crenças que envolviam uma deusa relacionada à esta bebida, a deusa Ninkasi. Obras literárias antigas mostram canções devotando e agradecendo à Ninkasi por proporcionar aos consumidores da bebida "alegria e felicidade" após a ingestão de algumas doses. No Egito a cerveja também possuía estima diferente pelos consumidores, por estar relacionada a rituais religiosos (DRAGONE et al., 2010; HORNSEY, 2016).

Inicialmente a cevada passava pelo processo de germinação, como ainda é feito atualmente, entretanto após ser moída, a cevada fermentada era moldada em formato de bolos seguindo com a adição do fermento. Estes eram assados e postos em água para iniciar a etapa de fermentação. Ainda é possível encontrar cervejas

produzidas desta forma no Egito, a qual é conhecida como Bouza. Após sua popularização, novos ingredientes começaram a ser adicionados à cevada e ao fermento. Acredita-se que o lúpulo foi acrescentado na fórmula da cerveja apenas na idade média, mais precisamente a partir do ano 1079. Contudo, apenas no século XVI foi aprovada a primeira legislação que regulamenta a fabricação de cervejas, a Lei Alemã “*Reinheitsgebot*”. Esta se tornou vigente após aprovação do Duque Guilherme IV, e dizia que a cerveja deveria ser produzida somente com cevada, lúpulo e água (DRAGONE et al., 2010).

No Brasil, o consumo de cerveja se deu por volta do século XIX, quando Dom João XI demonstrou seu hábito de ingestão da bebida, durante a estadia da família real no país. A cerveja era um produto caro, devido a necessidade de importação de outros países, mas em 1888 este viés foi minimizado com a fundação da Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia, na cidade do Rio de Janeiro. Anos após (1891) a Companhia Antártica Paulista foi fundada na cidade de São Paulo. No século XX novas cervejarias foram surgindo, dentre elas a Cerpa – Cervejaria Paraense (1966), Skol (1967), Kaiser (1980) e Primo Schincariol (1989). A Skol foi a primeira cervejaria a comercializar cervejas em latas, denominada Skol Pilsen. Exatamente em 2 de julho de 1999, houve a união da Companhia Antártica Paulista e da Cervejaria Brahma, dando origem a primeira multinacional brasileira (Ambev), a qual futuramente ganhou o título de terceira maior indústria cervejeira e quinta maior produtora de bebidas do mundo (AMBEV, 2019; DRAGONE et al., 2010; MORADO, 2009).

2.2 Matérias primas

2.2.1. Água

Na produção de bebidas fermentadas, como a cerveja, a água é o ingrediente principal. Portanto, a qualidade desta precisa ser assegurada a fim de garantir a fabricação de um produto também de boa qualidade. Para isto, legislações preconizam as características hábeis da água usada para este fim (WUNDERLICH; BACK, 2009). Segundo o DECRETO 6.871 (2009) a água usada na fabricação de cervejas deve ser potável, onde o tratamento da mesma poderá ser feito com substâncias químicas, processos físicos ou outro que assegure as características desejadas para boa qualidade do produto. Não só a potabilidade da água deve ser avaliada, outros parâmetros também são importantes, como pH e íons presentes.

Estes íons podem reagir com os íons da água, alterando o pH do meio. A presença de íons Ca^2 e Mg^2 , além de reduzirem o pH, também causam dureza da água. Cada um deles age de forma benéfica na fabricação de cervejas, quando em concentrações ideais. O cálcio mantém a estabilidade, sabor da bebida, protege enzimas contra desativação, evita turvação, além de estimular o metabolismo da levedura e favorecer a coagulação de proteínas. O magnésio exerce atividade similar, porém com menor intensidade. A manutenção do pH ácido é importante, pois atua na regulação da atividade enzimática, estabilidade, coagulação das proteínas do mosto e solubilização de compostos adstringentes (ROSA; AFONSO, 2015; WUNDERLICH; BACK, 2009).

2.2.2 Malte

2.2.2.1 Malte de cevada

A cevada, *Hordeum vulgare L.*, é quantitativamente a principal matéria-prima utilizada na fabricação de cerveja, depois da água. De acordo com o histórico de utilização pelo homem, o cultivo deste grão teve início por volta de 8000 a.C. no Crescente Fértil e no Norte da África. Inicialmente, era um dos principais itens da dieta alimentar do homem, tendo em vista seu alto valor nutritivo. Por volta do século XIX sua utilização foi expandida para nutrição animal e fabricação de cervejas (ALDUGHPASSI; WOLEVER; ABDEL-AAL, 2015). A cevada é reconhecida por sua versatilidade de cultivo, pois esta cresce em ambientes ríspidos, de difícil plantio. Outros fatores corroboraram para a expansão de seu uso, como: facilidade de germinação e produção de enzimas hidrolases; além do alto teor de amido e moderado teor de proteínas (beneficiando a ação das leveduras e dando origem a um sabor agradável à cerveja) (STEINER et al., 2012). Para ser utilizada na fabricação de cervejas, a cevada passa pelo processo de maltagem, onde é convertida em malte o qual será amassado e fermentado (LI; WANG; LIU, 2016).

Maltagem consiste na indução da germinação de grãos, resultando na produção e ativação enzimática (WUNDERLICH; BACK, 2009). O fornecimento de calor durante este processo resulta na produção de compostos responsáveis pela cor e sabor do produto final (GOODE; WIJNGAARD; ARENDT, 2005). As enzimas produzidas durante a maltagem convertem o amido em compostos disponíveis para serem utilizados pelas leveduras (STEINER et al., 2012). A β -amilase está presente na cevada *in natura*, mas a grande parte das enzimas, como α -amilase, proteases,

celulases e β -glucanases serão sintetizadas apenas após a germinação deste cereal. Todo o processo tem um rendimento de aproximadamente 80kg de malte a cada 100kg de cevada (LI; WANG; LIU, 2016).

Estudos como o de STEINER e colaboradores (2012) apontam o interesse da indústria em fabricar cerveja a partir de cevada e enzimas exógenas, substituindo a etapa de maltagem. Essa alternativa visa a diminuição da área de cultivo, de prejuízos as colheitas devido mudanças climáticas, entre outros fatores que corroboram para o aumento do preço do malte encarecendo o produto final. A princípio, a utilização da cevada associada às enzimas exógenas diminuiria o consumo de energia envolto no processo de secagem, assim como o consumo de água vinculado ao processo de infusão e germinação. Além disto, aumentaria o rendimento final, uma vez que durante a maltagem há uma perda da matéria-prima. Ao final do experimento, observaram que não houve diferença significativa entre a cerveja produzida com malte e a cerveja de cevada e enzimas exógenas, quanto ao aspecto sensorial. Esta última foi descrita como leve, boa estabilidade de espuma e características organolépticas semelhantes a cerveja produzida com malte, diferindo apenas nos teores de nitrogênio e proteínas.

Figura 2- Grãos e flocos de cevada



Fonte: UAI, 2015.

2.2.2.2 Malte de trigo

O trigo é um dos grãos mais utilizados na fabricação de cervejas, seja como adjuvante ou ingrediente principal. Segundo o Serviço de Pesquisa Econômica do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, de 5 a 10% do malte utilizado para a fabricação de cerveja é oriundo do trigo. Este número vem crescendo devido

a expansão do mercado de cervejarias e maltarias artesanais. Outro fator é a grande procura por cervejas com sabores diferenciados (JIN et al., 2018; LI; WANG; LIU, 2016).

Sua versatilidade de uso deve-se aos sistemas enzimáticos provenientes do processo de maltagem deste grão (LI; WANG; LIU, 2016). As cervejas de malte de trigo são classificadas como um tipo especial de cerveja, uma vez que a cevada é tradicionalmente utilizada. Esta é conhecida por sua turbidez, como as cervejas alemãs e as belgas (FALTERMAIER et al., 2014; GUO; JIN; DU, 2017). Existem três categorias de cervejas onde o malte de trigo pode ser utilizado: (1) *Lager utilizando o malte de trigo como adjuvante* - esta categoria é conhecida como de baixa fermentação ou fermentação de fundo, onde aproximadamente 5% de malte de trigo é adicionado com o intuito de melhorar a estabilidade da espuma e suavizar o gosto da cevada, ingrediente principal; (2) *Ale utilizando o malte de trigo como adjuvante* - esta categoria é conhecida como de alta fermentação e o malte de trigo é adicionado em concentração menor que 50%, sendo o malte de cevada ingrediente principal; (3) *Ale utilizando o malte de trigo como ingrediente principal* - mais de 50% de malte de trigo é utilizado, sendo o malte de cevada apenas um adjuvante. A utilização do malte de trigo possui vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens estão: aumento do rendimento e da espuma da cerveja, bem como redução do custo de produção. Além disto, há diminuição do teor de taninos, álcool amílico e β -glucano compostos responsáveis por conferir sabor desagradável à bebida e aumentar sua viscosidade. Já as desvantagens são redução da estabilidade da cerveja e diminuição de nitrogênio α -amino, tendo em vista que o teor de nitrogênio total interfere diretamente no crescimento da levedura e velocidade de fermentação (LI; WANG; LIU, 2016).

Figura 3- Grãos de trigo



Fonte: AGRANDA, 2019.

2.2.3 Lúpulo

O lúpulo é uma espécie de planta dióica e perene, do gênero *Humulus* e pertencente à família Cannabaceae. É comumente associada a fabricação de cervejas, no entanto possui atividades farmacológicas, como atividade sonífera. São conhecidas três espécies de lúpulo: *H. lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis*. Cada espécie é cultivada em regiões diferentes, sendo Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e latitudes norte 35° e 55° principais produtoras de *Humulus lupulus*; China e Japão produtoras de *Humulus japonicus*; e sul da China produtora de *Humulus yunnanensis*, espécie pouco conhecida. Para um adequado cultivo, faz-se necessário alguns fatores como luz (pelo menos 13h por dia), qualidades do solo e da água, pH acima de 6,5. Em países como África do Sul, é necessária utilização de luz artificial, uma vez que o dia tem curta duração, interferindo no crescimento da planta (LI; WANG; LIU, 2016)

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) foi inserido pela primeira vez no processo de fermentação da bebida em 1079 pelos alemães, devido às suas propriedades de conservação. Este confere sabor amargo a cerveja, além de aroma característico. Países como Alemanha e Estados Unidos são conhecidos pela alta produção de lúpulo (LI; WANG; LIU, 2016; WUNDERLICH; BACK, 2009). Constituintes do lúpulo, como resina de lúpulo, agentes aromatizantes e polifenóis, exercerem atividades importantes no processo de fabricação de cervejas. A resina de lúpulo é formada principalmente por α e β - ácidos, responsáveis pela propriedade amarga da planta, representando até 20% de seu peso seco. Estes ácidos aumentam a estabilidade de

espuma da cerveja, reduzem a carga microbiana e também aumentam a digestibilidade da bebida. Polifenóis de baixo peso molecular conferem atividade protetora a cerveja devido ao potencial antioxidante. Seus teores variam de acordo com o tipo de lúpulo, condições climáticas e condições do solo da área de cultivo, podendo representar de 4-14% de seu peso seco. O lúpulo de aroma possui baixos teores de α -ácidos, contudo elevados teores de óleos essenciais, já os lúpulos amargos tem elevados teores de α -ácidos e baixos teores de óleos essenciais. Para a fabricação de cervejas, além da escolha do tipo de lúpulo, também é importante escolher qual forma ele será utilizado. Pode ser como pellets ou extratos com etanol ou dióxido de carbono, sendo rara a utilização do cone da planta (WUNDERLICH; BACK, 2009).

Os tipos de compostos químicos presentes no lúpulo dependem da espécie e das condições de cultivo (LI; WANG; LIU, 2016). Os compostos fenólicos podem representar até 8% da composição química do lúpulo, dentre os quais estão flavonóis, flavanóis, ácidos fenólicos e flavonóides prenilados. Estes últimos estão diretamente relacionados com os benefícios à saúde humana. Os principais representantes dos flavonóides prenilados são xanthohumol, isoxanthohumol e 8-prenilnaringenina (MACHADO et al., 2019; PISTELLI et al., 2018). As flavonas encontradas no lúpulo estão correlacionadas as atividades antioxidante e quelante de metais. O óleo essencial do lúpulo tem em sua composição hidrocarbonetos monoterpenos (mirceno) e sesquiterpenos (α -humuleno, β -cariofileno, (E) - β -farneseno) que correspondem até 80% dos compostos, além de álcoois, ésteres e compostos carbonílicos (LI; WANG; LIU, 2016; PISTELLI et al., 2018).

Figura 4. - Lúpulo e *pellets* de lúpulo



Fonte: RNEWS, 2018; CERVEJA ARTESANAL, 2018.

2.2.4 Levedura

Para que se torne possível a fabricação de qualquer tipo e estilo de cerveja, é necessária a utilização de leveduras no processo de fermentação. Existem inúmeras espécies de leveduras aplicadas na confecção desta bebida devido ao avanço da engenharia genética, a qual melhora as características das cepas ou desenvolve novas linhagens (SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012).

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem por brotamento. Estas pertencentes ao filo Eumycophyta, da classe dos Ascomicetos (MONERAWELA; BOND, 2017). As leveduras utilizadas na fabricação de cerveja (gênero *Saccharomyces*) são classificadas em leveduras de alta e baixa fermentação. A levedura tradicionalmente utilizada na alta fermentação é a *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto a *Saccharomyces pastorianus* (conhecida também como *Saccharomyces carlsbergensis*) é utilizada na baixa fermentação (WALTHER; HESSELBART; WENDLAND, 2014). A *Saccharomyces pastorianus* é um híbrido, formado pelo cruzamento da *S. cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*.

Mesmo a *S. pastorianus* possuindo características de ambas as espécies, a tolerância a baixas temperaturas e as características do sabor, correspondem aos genes da *S. eubayanus* (LI; WANG; LIU, 2016). Outras espécies de leveduras, como a do gênero *Brettanomyces* são utilizadas na fabricação de cervejas especiais (WUNDERLICH; BACK, 2009).

As leveduras de alta fermentação dão origem a cerveja do tipo Ale, portanto são conhecidas como leveduras Ale. Estas precisam de temperaturas mais elevadas, por volta de 15 a 24°C, para fermentação. Este processo demora cerca de 5 a 7 dias, e ao final estes micro-organismos flutuam até se concentrarem no topo do tanque de fermentação. Os açúcares facilmente fermentados por essa espécie são glicose, maltose e sacarose. As leveduras de baixa fermentação são utilizadas na fabricação de cervejas do tipo lager. Estas precisam de temperaturas relativamente baixas, por volta de 10°C e levam de 2 a 7 dias para realizar o processo de fermentação. Ao final, as células floculam e se depositam no fundo do tanque, podendo ser retiradas e reutilizadas em uma nova etapa de fermentação. As leveduras lager assimilam facilmente os açúcares glicose, frutose, sacarose, maltose, maltotriose, galactose, rafinose e melibiose (HARRISON, 2017; LI; WANG; LIU, 2016).

Figura 5- Levedura *S. cerevisiae*



Fonte: SPITALFIELDS LIFE, 2013.

2.2.5 Adjuntos do malte

Adjuntos do malte representam uma forma de substituir parte do malte utilizado na fabricação de cervejas, por outra fonte fermentável. Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2009), “consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada

cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteado ou não-malteado, bem como os amidos e os açúcares de origem vegetal “. Esta substituição é feita com o intuito de reduzir o custo de produção da bebida, uma vez que o malte é mais caro do que os adjuntos. Outra justificativa para essa substituição é melhorar algumas propriedades da cerveja, como cor, sabor, estabilidade da espuma (STEWART, 2017). A utilização dos adjuntos varia entre os países, sendo proibidos por alguns. A legislação alemã, Reinheitsgebot, estabelece que para a fabricação de cervejas só é permitida a utilização de malte, água, levedura e lúpulo. Contudo, a legislação brasileira (BRASIL, 2009) estabelece que "Quando se tratarem de açúcares vegetais diferentes dos derivados de cereais, a quantidade máxima de açúcares empregados em relação ao seu extrato primitivo será: na cerveja clara, menor ou igual a 10% em peso; na escura, menor ou igual a 50% em peso, podendo conferir ao produto acabado as características de adoçante; cerveja extra, menor ou igual a dez por cento do extrato primitivo".

2.2.5.1 Arroz

As cervejas especiais utilizam ingredientes ou processos de produção diferentes das cervejas tradicionais. A procura por estas vem crescendo não só pelo sabor diferenciado, mas também pelas necessidades relacionadas a saúde de determinados consumidores. Um exemplo são as cervejas sem glúten, as quais podem ser produzidas com arroz, entre outros cereais, destinando-se aos portadores de doença celíaca (CECCARONI et al., 2019; MAYER et al., 2016).

Algumas características fazem do arroz uma boa alternativa para substituição de parte do malte, como baixo custo, menor teor de gordura e proteínas, além de maior teor de amido (75 a 85%), quando comparado ao malte tradicionalmente usado (LI; WANG; LIU, 2016). O arroz confere sabor leve e cor pálida, característico das cervejas do tipo lager (STEWART, 2015). Somente alguns tipo de arroz podem ser utilizados na fabricação de cervejas. Para a seleção do tipo de arroz correto, é preciso observar a temperatura de gelatinização, umidade, teor de óleos e proteínas, entre outros fatores.

CECCARONI e colaboradores (2019) investigaram o uso de arroz na produção de maltes especiais (caramelizado e escuro), objetivando melhorar os aspectos físicos da cerveja, como cor, sabor e corpo da cerveja de malte de arroz sem glúten. Realizaram a caramelização do malte, através de torrefação, o que

proporcionou sabor mais marcante e alterou a cor da cerveja de pálida para âmbar. Observou-se um alto teor de polifenóis e boa capacidade antioxidante nos maltes especiais obtidos.

Em outro estudo, realizado por MAYER e colaboradores (2016) foram desenvolvidas três cervejas 100% com malte de arroz, utilizando as variedades de arroz italiano: Centauro da Sardenha (8,51% de proteína), Centauro do norte da Itália (7,62% proteína) e Balilla (7,44% de proteína). O objetivo deste foi observar o comportamento do malte de cada tipo de arroz nas etapas de produção da cerveja, além de analisar as características sensoriais das cervejas produzidas. Ao final do estudo, foi possível desenvolver uma cerveja com perfil sensorial semelhante a cerveja lager produzida com malte de cevada, contudo algumas alterações no processo de produção devem ser feitas a fim de melhorar a qualidade do produto final.

Figura 6- Grãos de arroz



Fonte: UAI, 2015.

2.2.5.2 Milho

O milho é uma planta angiosperma, do gênero *Zea*, pertencente a espécie *Zea mays* (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). Este possui diversas aplicações no ramo alimentar, sendo utilizado desde a confecção de rações animais à produção de cervejas. Países dos continentes europeu e americano, são conhecidos por utilizarem com frequência esse cereal como adjunto do malte na fabricação de cervejas. Dentre estes, estão os Estados Unidos e Canadá (STEWART, 2017).

Assim como outros cereais, o milho é formado por diferentes estruturas, como: pericarpo, endosperma, germe e pedicelo, onde cada uma destas possui composições químicas diferentes (GOMES et al., 2004). Para a fabricação de cervejas, é necessário remover o germe, pois este é rico em ácidos graxos, compostos que afetam diretamente a qualidade da cerveja, prejudicando tanto a estabilidade quanto o sabor do produto. Ao comparar o milho com o arroz, este último é preferencialmente utilizado na fabricação de cervejas por possuir menor teor de gordura, proteínas e celulose, assim como concentração maior de amido. Contudo, a utilização de milho na fabricação de cervejas se torna uma boa alternativa devido ao seu alto rendimento, ampla distribuição e composição semelhante à do arroz (LI; WANG; LIU, 2016).

Figura 7- Espiga de milho



Fonte: UAI, 2015.

2.2.5.3 Sorgo

O sorgo é uma planta de origem africana, pertencente à família Graminae e ao gênero *Sorghum*. Este é amplamente cultivado, devido a capacidade de crescer em ambientes de difícil plantio. O sorgo representa um dos cereais mais cultivados no mundo, ficando atrás apenas do trigo, milho, arroz e cevada. Este cereal pode ser utilizado na fabricação de cervejas devido algumas vantagens, como baixo custo e ausência de glúten, possibilitando o consumo por pessoas com doença celíaca. Entretanto, algumas desvantagens fazem com que não seja comum sua aplicação na produção de cervejas, entre elas estão a alta temperatura de gelatinização (> 70 °C) e o baixo poder diastático, que se refere a capacidade das enzimas, α e β -

amilase, hidrolisarem o amido, liberando em açúcares menores. Contudo, medidas podem ser adotadas com o intuito de minimizar suas limitações de uso, como: selecionar o tipo adequado de sorgo, o qual apresente baixa temperatura de gelatinização e alto poder diastático; além da otimização dos processos de fabricação, como maltagem e mosturação, visando identificar tempo, temperatura e pH mais favoráveis á ação enzimática (RODRÍGUEZ; AGUILAR; ALMEIDA E SILVA, 2018).

Figura 8- Grãos de sorgo



Fonte: ALVES, 2018.

2.2.5.4 Xarope

Os xaropes são adjuntos líquidos utilizados na fabricação de cervejas. Estes representam uma fonte concentrada de carboidratos fermentáveis, sendo acrescentados diretamente no mosto em ebulição. Os principais representantes desta classe são: xarope de glicose (originado de grãos como milho e trigo); cana-de-açúcar (composto por sacarose de cana-de-açúcar ou beterraba) e invertidos (mistura de glicose e frutose originada da hidrólise da sacarose) (HELSTAD, 2013). Há também xarope de chocolate, que devido a cor escura, são utilizados apenas na fabricação de cervejas pretas. Esta coloração é atribuída as melanoidinas, compostos químicos originados da reação de Maillard, a qual consiste na combinação de açúcares redutores com aminoácidos, mediante exposição a altas temperaturas (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017; STEWART, 2017).

Na obtenção de xaropes de açúcar podem ser utilizadas matérias primas, como frutas, plantas, cana-de-açúcar, além de cereais ricos em amido (milho, aveia, trigo, cevada). Seu uso na produção de cervejas tem diversas vantagens, como

facilidade de incorporação no mosto, atribuir características como cor clara, sabor fresco e alta atividade antioxidante, além de reduzir os custos de produção, pois o xarope substitui uma parte do malte utilizado. (LI; WANG; LIU, 2016).

A qualidade do xarope interfere diretamente na qualidade da cerveja produzida. Variáveis como pH, temperatura, tempo de armazenamento e concentração devem ser observadas e mantidas dentro da faixa adequada, a fim de manter a estabilidade do xarope. O armazenamento por longo tempo em temperaturas elevadas pode ocasionar uma reação de escurecimento, devido a formação de melanoidinas, catalisada pela presença de íons metálicos e proteínas (HORNSEY, 2012). Esses compostos químicos alteram a estabilidade e sabor da cerveja, tornando-a amarga. Para inibir esta formação, recomenda-se a adição de sulfitos, contudo estes podem desencadear reações adversas nos consumidores (STEWART, 2017).

2.2.6 Enzimas

Cada etapa da produção de cerveja corrobora de forma significativa para a qualidade do produto final. A maltagem é uma das mais importantes, pois seu objetivo é produzir enzimas hidrolíticas capazes de clivar o amido e proteínas, presente do cereal utilizado, liberando moléculas menores de açúcares, os quais são facilmente fermentáveis pelas leveduras (AGU; PALMER, 1996). As enzimas mais importantes na fabricação de cervejas são α -amilase, β -amilase, dextrinase, α -glicosidase e proteases. As amilases são responsáveis por catalisar a hidrólise do amido, atuando diretamente nas ligações glicosídicas α (1,4). Entretanto há diferenças no mecanismo de ação das enzimas α e β -amilase. A α -amilase, pertencente às endonucleases, agindo de forma aleatória nas ligações glicosídicas internas da molécula de amido, resultando na liberação de oligossacarídeos e glicose livre. O pH ótimo para sua atividade é 5, e temperatura ótima é 70°C. Já a β -amilase age sobre a ligação glicosídica da extremidade não redutora, liberando moléculas de maltose. Seu pH ótimo é 5.5 e temperatura ótima é 50°C (LI; WANG; LIU, 2016). A capacidade dessas enzimas hidrolizarem o amido é denominado poder diastático. Além da ação dessas duas enzimas, a molécula de amido precisa da dextrinase para hidrolisar as ligações do tipo α (1,6) próximas as ramificações. Seu melhor desempenho acontece em pH 5 a 60°C (MANNERS; MARSHALL; YELLOWLEES, 1970). A α -glicosidase age de forma similar a β -amilase, contudo

promove a liberação de glicose livre. Sua faixa de pH ótimo é 3.7 a 4. As enzimas proteolíticas (proteases) podem ser divididas em: endopeptidase, aminopeptidase, carboxipeptidase e dipeptidase, onde a endopeptidase atua clivando ligações peptídicas entre a proteína e o polipeptídeo; a aminopeptidase catalisa a clivagem de aminoácidos do terminal amino de proteínas ou peptídeos; a carboxipeptidase hidrólisa o peptídeo ligado à extremidade carboxílica da cadeia peptídica; e a dipeptidase hidrolisa apenas ligações peptídicas que conectam dois peptídeos. Os tipos de proteases que clivam ligações peptídicas terminais, são conhecidas como exopeptidases (LI; WANG; LIU, 2016).

2.3 Etapas de produção

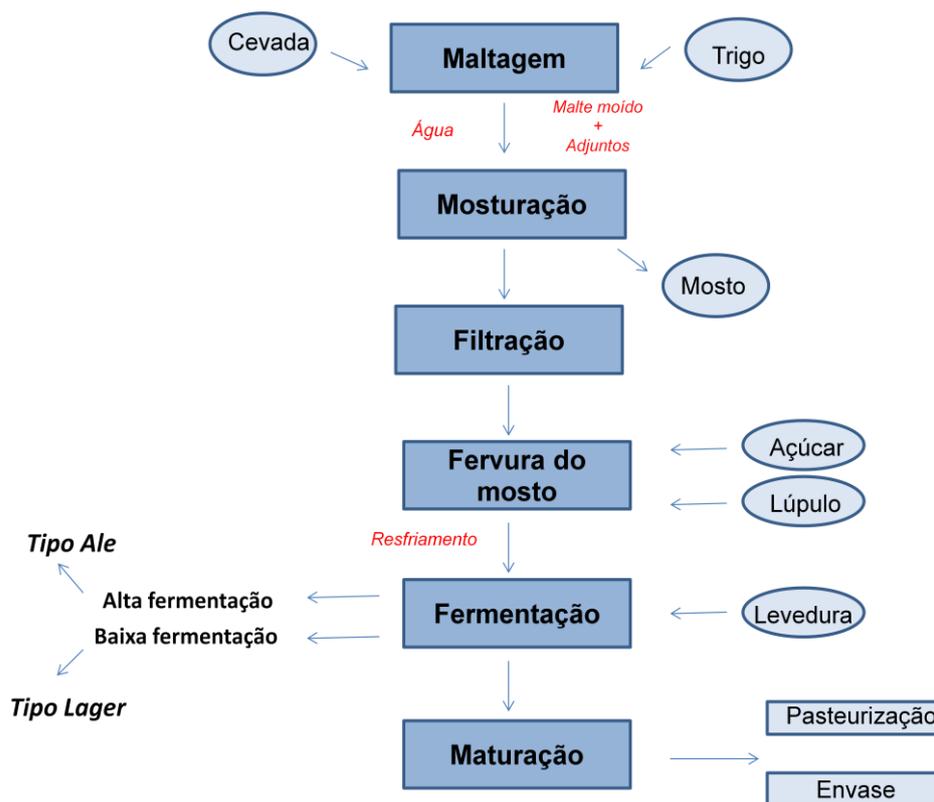
O processo de produção de cervejas pode ser dividido em seis etapas: maltagem, mosturação, filtração do mosto, fervura do mosto, fermentação e maturação, conforme ilustrado na figura 7 (BORTOLI et al., 2013; MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Inicialmente, os grãos do cereal escolhido são postos em água para germinar e dar origem ao malte. Uma vez que o malte foi torrado e moído, ocorre a adição de água e adjuntos. A utilização do coque, combustível oriundo da hulha, para a secagem do malte é considerada uma inovação, pois evita que os grãos torrem, exalem aroma de fumaça e produz uma cerveja mais clara (FERREIRA et al., 2011). A mistura obtida é cozida e, durante esse processo, o amido do malte é transformado em açúcar, tendo como resultado um líquido turvo e grosso, chamado mosto. Em seguida, ocorre a filtração desse mosto e uma nova fervura, onde é adicionado o lúpulo (responsável pelo sabor amargo da cerveja). Posteriormente, o mosto é resfriado a aproximadamente 20°C, seguindo para a etapa de fermentação após inoculação das leveduras. Esta etapa tem a duração de 10 dias, portanto é considerado a mais longa. A próxima etapa é a maturação, onde há diminuição da temperatura da bebida, o fermento é retirado e a cerveja permanece em repouso. Por fim ocorre o envase e pasteurização da cerveja (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011).

A fermentação das cervejas consiste na conversão da glicose em etanol e gás carbônico, em condições anaeróbicas, por leveduras. Alguns aspectos devem ser levados em consideração para a produção de cervejas de boa qualidade, como a seleção do micro-organismo, cinética fermentativa, contaminação, temperatura e volume de mosto. O metabolismo é um dos fatores responsáveis por conferir o sabor

e aroma característicos das cervejas tanto artesanais, quanto comerciais (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). As cervejas artesanais, assim como as comerciais, possuem diversos tipos. As intituladas Lager são as mais populares no mundo e são produzidas com cepas de *Saccharomyces calshbergensis*. Já as cervejas Ale são produzidas com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ARAÚJO; SILVA; MINIM, 2003).

Os processos envolvidos na produção de cervejas artesanais diferem das cervejas comerciais. As artesanais requerem técnicas mais simples e com equipamentos menos sofisticados. Além disso, a tecnologia também é menor e há controle menos rígido dos processos. Contudo, a teoria por trás dos dois processos de produção é a mesma (GÓMEZ-CORONA et al., 2016).

Figura 9- Fluxograma das etapas de produção de cervejas



Fonte: MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011.

2.4 Propriedades biológicas da cerveja

2.4.1 Atividade antioxidante

A cerveja é uma bebida rica em compostos antioxidantes, os quais provém das matérias-primas utilizadas ou de reações químicas que ocorrem durante as etapas de produção. A espécie de levedura também é um fator que influencia diretamente na concentração e tipo de compostos antioxidantes gerados. O malte e o lúpulo são as fontes mais importantes para obtenção desses compostos. A cevada da origem ao ácido ferúlico, potente antioxidante. Já o lúpulo é a única fonte de origem do xanthohumol/isoxanthohumol, um dos principais polifenóis encontrado na cerveja. Outro composto fenólico importante encontrado no lúpulo é a 8-prenilnaringenina (MONTANARI et al., 1999; PISTELLI et al., 2018; YAMAGUCHI; SATOH-YAMAGUCHI; ONO, 2009). A presença destes na bebida, melhora aspectos como estabilidade, sabor e cor, evitando a oxidação pelo oxigênio presente na hora do envase (TAFULO et al., 2010; ZHAO, 2014). Em estudo realizado por Cheiran e colaboradores (2019), foi possível observar que os principais grupos de compostos fenólicos presentes em cervejas, são: ácidos fenólicos (ácido gálico e isômeros do ácido dihidroxibenzóico), flavonóides glicosilados (quercetina hexosídeo rutinosídeo, apigenina-C-glicosídeo-C-pentosídeo I) e agliconas (epicatequina, quercetina, catequina). Dentre os antioxidantes endógenos mais importantes, encontrados na cerveja, estão os compostos fenólicos e as melanoidinas (ZHAO, 2014).

2.4.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão presentes em diversas bebidas, como vinhos e cervejas. São conhecidos principalmente por sua atividade antioxidante, atuando através da doação de elétrons, culminando na eliminação de radicais livres (ZHAO, 2014). A ingestão diária de compostos fenólicos através da alimentação pode combater o estresse oxidativo, mecanismo relacionado ao desenvolvimento do diabetes, aterosclerose, envelhecimento, doenças neurodegenerativas, câncer, entre outras disfunções (PIAZZON; FORTE; NARDINI, 2010).

Os compostos fenólicos presentes na cerveja são: taninos, proantocianinas, ácidos fenólicos e flavonóides, sendo os dois últimos principais representantes desta classe de compostos (ZHAO et al., 2010). Os ácidos fenólicos são facilmente absorvidos, biocompatíveis e apresentam alta atividade antioxidante. Originam-se principalmente do lúpulo e cevada, contudo algumas variáveis podem interferir

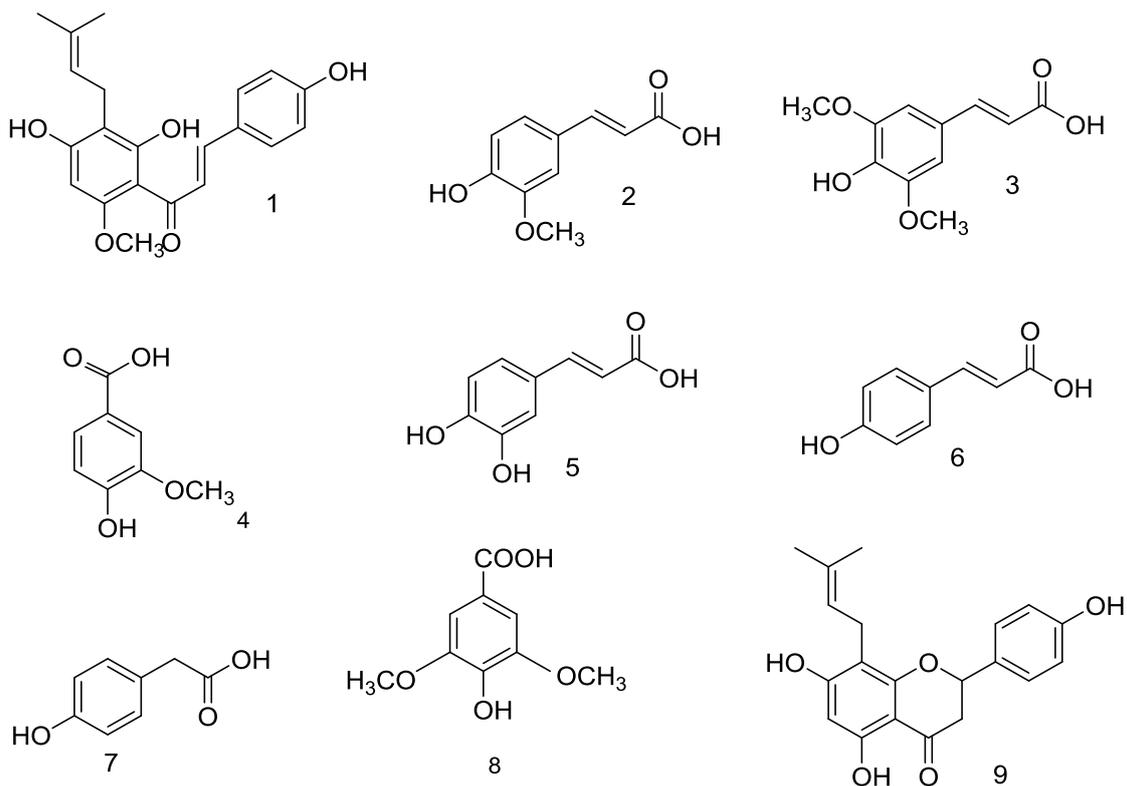
diretamente em seus teores: características genéticas das matérias primas, condições de cultivo e climáticas (PIAZZON; FORTE; NARDINI, 2010). Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos exercem influência direta sobre características sensoriais da cerveja, como sabor, cor e estabilidade (OLIVEIRA NETO et al., 2017) .

Quando comparadas entre si, cervejas escuras possuem maior teor de compostos fenólicos do que as mais claras, podendo ser explicado pela maior presença de cevada maltada utilizada na fabricação (GRANATO et al., 2011). Segundo Piazzon e colaboradores (2010) os teores totais de polifenóis e ácidos fenólicos variam muito entre os diferentes tipos de cerveja com valores mais altos para cervejas Bock, Abbey e Ale e menores em cervejas sem álcool. Sendo o ácido ferúlico mais abundante ácido fenólico presente na cerveja, seguido dos ácidos sinápico, vanílico, cafeico, *p*-cumárico e 4-hidroxifenilacético. Entretanto, os ácidos ferúlico, cafeínico, síringico, sinápico e, em menor medida, vanílico estão presentes nas cervejas principalmente na forma conjugada, enquanto os ácidos *p*-cumárico e 4-hidroxifenilacético estão geralmente presentes igualmente nas formas livre e conjugada. Grande parte dos ácidos fenólicos encontrados no malte e no lúpulo, estão conjugados a polissacarídeos, como amido, podendo ser liberados por hidrólise enzimática durante etapa de esmagamento (ZHAO, 2014).

O aumento do consumo mundial de cervejas artesanais, leva à realização de estudo que se propõe a elucidar compostos relacionados às características sensoriais da bebida, assim como os benefícios que os mesmos conferem à saúde (AQUILANI et al., 2015). Cheiran et al. (2019) identificaram 57 compostos fenólicos em cervejas dos tipos Ale (India Pale Ale e Weiss) e Lager, obtidas de três cervejarias artesanais brasileiras. Doze compostos foram identificados pela primeira vez em cervejas: ácido 4-di-hidroxibenzóico, ácido 2,3-di-hidroxibenzóico, ácido dimetoxibenzóico, ácido 3-*p*-coumaroilquinóico, ácido 4-*p*-coumaroilquinínico, hexosídeo de taxifolina, quercetina dihexosídeo, ácido 3-ferulolilóico, ácido 4-ferulolilóico, ácido 5-ferulolilóico, apigenina-6,8-C-dipentosídeo e hexosídeo de isofraxidina. Após análise dos 3 estilos, foi possível estabelecer os compostos fenólicos capazes de diferenciar as cervejas artesanais entre si: ácidos cafeico e coumarolínico, ácido coumarico, caempferol-3-O-rutinosido e proantocianidina B dímeros III e V.

Dentre os polifenóis presentes na cerveja, o xanthohumol é o único encontrado apenas neste tipo de bebida. Este é uma chalcona prenilada, a qual está presente em concentrações distintas na cerveja, variando com o tipo e quantidade de lúpulo utilizado (DING et al., 2011). O número de prenilações aumenta a lipofilicidade da molécula, assim como sua atividade antioxidante. Isto está relacionado com os inúmeros benefícios atribuídos ao xanthohumol, embora represente a minoria dos compostos polifenólicos presentes na bebida (ELROD, 2018).

Figura 10- Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados na cerveja (1) Xanthohumol (2) Ácido ferúlico (3) Ácido sinápico (4) ácido vanílico (5) Ácido caféico (6) Ácido-*p*-cumárico (7) Ácido 4-hidroxifenilacético (8) Ácido siríngico (9) 8-prenilnaringenina



Fonte: ELABORADA PELO AUTOR.

2.4.1.2 Melanoidinas

As melanoidinas são um conjunto de compostos nitrogenados, de alto peso molecular e cor escura, originadas da reação de Maillard (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017). Esta reação consiste na interação de açúcares redutores com proteínas ou aminoácidos. Na fabricação de cervejas, esta reação ocorre durante a

maltagem e obtenção do mosto. Estas moléculas, assim como os compostos fenólicos, influenciam na estabilidade da cerveja, sabor, aroma e na cor. As melanoidinas também ajudam na preservação da bebida contra oxidação, além de possuir capacidade quelante de metais. Possuem diversos efeitos benéficos à saúde além da atividade antioxidante, como antimicrobiana, antiinflamatório e antihipertensiva. Contudo, melanoidinas, especialmente as de baixo peso molecular podem desempenhar atividade pro-oxidante (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017; RIVERO et al., 2005; ZHAO, 2014).

2.4.2 Atividade na doença cardiovascular

A doença cardiovascular é uma das principais causas de morte da atualidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças não transmissíveis, como a doença cardiovascular será uma das principais causas de morte até 2020, resultando em mortes prematuras (menos de 70 anos) (ISLAM et al., 2014). Inúmeros fatores de riscos estão envolvidos no desenvolvimento da doença cardiovascular e processos ateroscleróticos, dentre eles a diabetes, hipertensão, obesidade, hiperlipidemia, sedentarismo, pré-disposição genética, consumo excessivo de álcool e estresse oxidativo (CSALA et al., 2015; GONZÁLEZ-SANJOSÉ; RODRÍGUEZ; VALLS-BELLÉS, 2017).

É recomendado o consumo moderado de bebidas alcoólicas, associado a mudanças dos hábitos alimentares, visando reduzir as complicações relacionadas as doenças cardiovasculares (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2015). A cerveja possui inúmeros compostos bioativos, como os polifenóis, os quais estão relacionados com os efeitos cardioprotetores da bebida, aumentando as lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo agregação plaquetária, além dos níveis de colesterol e triglicérides (GONZÁLEZ-SANJOSÉ; RODRÍGUEZ; VALLS-BELLÉS, 2017). Em estudo realizado por VILAHUR et al. (2014), foi possível observar que os componentes não-alcoólicos da cerveja (isoxanthohumol) são responsáveis pela proteção contra a disfunção endotelial coronariana induzida pela hiperlipemia. Estes combatem o dano oxidativo vascular e preservam a sinalização da via Akt / eNOS, reduzindo a ocorrência da aterosclerose. Em outro estudo, realizado por CHIVA-BLANCH et al. (2015) foram avaliados os efeitos da cerveja e do gim sobre as células progenitoras endoteliais circulantes. Homens com alto risco de doença cardiovascular consumiram moderadamente cervejas com álcool, sem

álcool e gim por 4 semanas. Concluiu-se que a fração não alcoólica da cerveja aumenta o número de células progenitoras endoteliais circulantes em indivíduos de alto risco cardiovascular. Este mecanismo que pode explicar os efeitos cardioprotetores da cerveja em relação às bebidas alcoólicas destiladas na população de alto risco cardiovascular.

2.4.3 Atividade anticarcinogênica

A cerveja pode possuir atividade anticarcinogênica, devido aos polifenóis presentes em sua composição, como 8-prenilnaringenina, isoxanthohumol, e em especial o xanthohumol (GONZÁLEZ-SANJOSÉ; RODRÍGUEZ; VALLS-BELLÉS, 2017). Alguns mecanismos pelos quais o xanthohumol exerce essa atividade são conhecidos. Dentre eles a relação desta molécula com o sistema enzimático P450. O xanthohumol inibe a família 1A das enzimas de Fase I (responsáveis por ativar os carcinógenos), além de causar a indução das enzimas de Fase II (responsáveis pela excreção dos carcinógenos), eliminando-os antes de causar danos ao organismo (CHIVA-BLANCH et al., 2014; ELROD, 2018). Outro mecanismo seria através da promoção da morte celular pelo aumento dos radicais livres nas células cancerosas, levando a apoptose e redução da proliferação. Este mecanismo não está relacionado à atividade antioxidante da molécula, mas sim à presença de um grupo cetona eletrofílico na estrutura do xanthohumol. Este grupo interage diretamente com proteases, como NF- κ B, suprimindo seu funcionamento através da modificação dos resíduos de cisteína. A inibição da NF- κ B proporciona a redução de fatores inflamatórios e inibição da angiogênese no câncer (JACOB; JAMIER; BA, 2011). O xanthohumol também possui atividade inibitória sobre o TNF- α , proteína importante na tumorigênese (GUPTA et al., 2014).

2.4.4 Atividade antidiabética

Fitonutriente pode ser uma alternativa viável para o tratamento paliativo do diabetes. O xanthohumol possui efeitos sobre essa síndrome, pois é capaz de aumentar o metabolismo, bem como reduzir os níveis de glicose circulante. Estes efeitos podem ser atribuídos à inibição da enzima α -glicosidase, responsável pelo fracionamento do amido em glicose, diminuindo os níveis glicêmicos. Esta molécula age também elevando os níveis de adiponectina, hormônio de origem proteica responsável pela modulação de processos metabólicos, como a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos. Aumentando a síntese deste hormônio,

há o aumento da sensibilidade à insulina. A utilização do xanthohumol diminui processos inflamatórios, bem como o estresse oxidativo, favorecendo então o processo de neovascularização e conseqüentemente a cicatrização das feridas diabéticas (LIU et al., 2015).

2.5 Biodiversidade vegetal da Amazônia com potencial fonte na indústria de alimentos

A Amazônia é conhecida mundialmente por sua biodiversidade de fauna e flora. Esta possui a maior floresta tropical do mundo, com cerca de 6,7 milhões de km², dentre os quais 4,1 milhões representam a Amazônia Brasileira. Aproximadamente 10% da biodiversidade mundial se encontra nesta região, a qual é composta por 53 ecossistemas e 45 mil espécies de plantas e animais vertebrados (ARPA, 2010).

A riqueza florestal predominante na região amazônica proporciona um grande interesse no âmbito de novas descobertas relacionadas à pesquisa, como elaboração de cosméticos, medicamentos e alimentos. Plantas e frutos característicos desta região podem ser utilizados pela indústria alimentícia com o intuito de conferir sabor, além de agregar atividades biológicas ao alimento fabricado. Inúmeras espécies são conhecidas por suas atividades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antidiabética, entre outras (ARPA, 2010).

O jambú (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) é uma erva nativa da região norte do Brasil, onde é amplamente utilizado na culinária local, além de ser empregado em tratamentos empíricos de doenças como: anemia, reumatismo, tratamento de doenças no trato digestivo e gripe. Sabe-se que esta planta possui diversos bioativos, contudo o spilanthol é alvo de estudos por possuir atividades biológicas importantes, dentre elas propriedades anestésicas e anti-inflamatórias (NEVES et al., 2019).

Pripríoca (*Cyperus articulatus*) é uma erva com propriedades farmacológicas no tratamento de enxaquecas, dores de cabeça mais leves e convulsões. Em prospecção fitoquímica, foi confirmada a presença de alcalóides, flavonóides, quinona, compostos fenólicos, saponinas, terpenos e esteróides. Estes compostos podem estar relacionados com as atividades antioxidantes da planta, *in vitro* e *in vivo* (HERRERA-CALDERON et al., 2018).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um fruto amazônico bastante utilizado na culinária local, onde sua polpa dá origem a sucos, geleias, balas e suas sementes podem ser utilizadas na fabricação de um doce semelhante ao chocolate, denominado cupulate. Este fruto possui elevados teores de ácido ascórbico (102 mg/100g) e compostos fenólicos, como a catequina (3.5 a 4.9/ g). Estudos mostram que o licor de cupuaçu possui atividade redutora do perfil lipídico e atividade antioxidante de ratos diabéticos (PEREIRA; ABREU; RODRIGUES, 2018).

O açai (*Euterpe oleracea Mart*) é um dos frutos amazônicos mais estudados, devido à alta concentração de compostos bioativos que contribuem para sua elevada atividade antioxidante. Dentre eles estão: orientina, homoorientina, vitexina, luteolina, crosseriol, quercetina, dihidrokaempferol e antocianinas, os quais pertencem ao grupo de polifenóis denominados flavonóides. As antocianinas são compostos glicosilados responsáveis por conferir cor de vermelho a roxo, a plantas e frutos. O extrato de açai é rico em antocianinas, um dos principais compostos responsáveis pela bioatividade do fruto. Ensaios *in vitro* demonstraram que o açai possui atividade cardioprotetoras, na prevenção da cardiotoxicidade, na inibição da N-nitrosometilbenzilamina, na tumorigênese e diminuição no dano inflamatório (GARZÓN et al., 2017; PEIXOTO et al., 2016)

O cajá (*Spondias mombin* L.), também conhecido como taperebá na região norte do Brasil, pertence à família Anacardiaceae. Este fruto é muito apreciado na culinária brasileira, servindo como matéria prima para confecção de geleias, sucos e sorvetes. Entretanto, tanto o fruto quanto as folhas possuem atividades farmacológicas, como propriedades hipoglicemiantes, antivirais antimicrobianas, leishmanicidas, antiedematogênicas e antioxidantes. Compostos fenólicos (ácido clorogênico e ácido elágico) e flavonóide (isoquercetina) foram identificados em extratos das folhas de *S. mombin*, corroborando para as atividades biológicas relatadas (CABRAL et al., 2016).

Puxuri ou pixuri (*Licaria puchury-major*) é uma árvore nativa da Amazônia, a qual produz sementes aromáticas que servem como tempero na culinária local. A literatura relata que o safrol, ácido dodecanóico, α -terpineol e eugenol são os compostos mais encontrados no óleo essencial das sementes. Dentre as propriedades medicinais desta planta, encontram-se: tratamento de dores no intestino e estômago, insônia e irritabilidade. Observou-se também que este óleo

possui a capacidade de inibir a proliferação de células leucêmicas humanas (AZEVEDO et al., 2018; SANCHES; TROVATI; CHIERICE, 2008).

Araçá-boi (*Eugenia stipitata*) é uma planta pertencente à família Myrtaceae, facilmente cultivada em regiões úmidas e tropicais, como a floresta amazônica. Da origem a frutos de cor amarela e sabor ácido. A *E. stipitata* é rica em compostos bioativos, onde os mais importantes descritos na literatura, são: terpenos, quercetina, vitamina C, fibras e compostos fenólicos. A ação destes, principalmente os compostos fenólicos, está relacionada a atividade antimutagênica, antígenotóxica, antioxidante e hipoglicemiantes da espécie (NERI-NUMA et al., 2013).

Camu-camu ou araçá-d'água (*Myrciaria dubia*) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, a qual cresce com facilidade em regiões inundadas. É amplamente encontrada na floresta amazônica, Venezuela, Colômbia e Bolívia (CASTRO; MADDOX; IMÁN, 2018). O camu-camu é alvo de muitas pesquisas devido seus altos teores de vitamina C (4000 mg/ 100g de polpa). Este composto, assim como sua forma oxidada, ácido desidroascórbico, possuem elevada atividade antioxidante. Outras atividades biológicas são atribuídas a vitamina C, como prevenção do sangramento de mucosas, síntese de colágeno, processo cicatricial, absorção de ferro e fortalecimento do sistema imunológico (CUNHA-SANTOS et al., 2019). Além do seu alto teor de vitamina C, vitaminas do complexo B e vitamina A, este fruto possui fitoquímicos bioativos que proporcionam sua utilização popular no tratamento de doenças como a asma, gripe, aterosclerose, depressão, glaucoma, gengivite, hepatite, catarata, infertilidade, enxaqueca, osteoporose, Parkinson e malária. Dentre os compostos já identificados nessa espécie, estão: cianidina-3-glicosídeo, ácido betulínico e 1-metilmalato (CASTRO; MADDOX; IMÁN, 2018).

A árvore *Platonia insignis* Mart, conhecida popularmente como bacurizeiro, pertence à família Clusiaceae. Sabe-se que essa planta teve origem na Amazônia Oriental, contudo é possível encontrá-la na Guiana, Bolívia, Equador, Peru e Colômbia. Esta árvore da origem ao fruto bacuri com formato arredondado e de cor amarela. O fruto é bastante rico nutricionalmente devido ao alto teor de vitaminas, fibras e minerais. Além disto, no âmbito da pesquisa, outra característica é importante, sua atividade antioxidante. Compostos bioativos como xantonas, ácido ascórbico e polifenóis já foram identificados em sua composição. Sua principal utilização medicinal é no tratamento de doenças dermatológicas (JACOMINO; PINTO; GALLON, 2018).

As espécies de plantas e frutos citados anteriormente, tem sido utilizadas na produção de cervejas na região norte, particularmente nos estados do Amazonas e Pará. Dependendo da etapa de produção, da forma e concentração das matérias primas adicionadas, estas podem conferir propriedades antioxidantes, assim como outras atividades biológicas às cervejas regionais, além de representar uma estratégia para obtenção de produtos fermentados com aroma e sabor exclusivos. O uso de matérias primas amazônicas, para produção de alimentos ou como adjuvantes na fabricação de cervejas, pode ser considerada promissora não só por conferir características diferenciadas, mas também por possibilitar a difusão e valorização de espécies nativas.

2.6 Compostos voláteis da cerveja

O perfil de aroma de uma cerveja varia de acordo com as matérias primas utilizadas em sua fabricação, contudo alterações das etapas de produção podem influenciar estes teores. A cevada maltada, o lúpulo e espécie de levedura são as principais fontes de compostos de aroma deste tipo de bebida (STEFANUTO et al., 2017). O óleo essencial de lúpulo possui inúmeros compostos responsáveis pelo aroma característico da planta, como hidrocarbonetos, compostos oxigenados e com enxofre. Dentre os principais estão o mirceno, α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno (PISTELLI et al., 2018). Outra variável importante é a temperatura de fermentação, sendo relatado que cervejas de baixa fermentação possuem melhor aroma em relação à alta fermentação (OLANIRAN; MAHARAJ; PILLAY, 2011).

Tendo em vista a importância do aroma para a cerveja e a diversidade de matérias primas empregada na fabricação desta bebida, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar o perfil de compostos voláteis presentes em cervejas de diferentes tipos e estilos. Pistelli et al. (2018) analisaram o perfil de voláteis de cinco cultivares de lúpulo polonês, tanto saudáveis quanto infectados por vírus e viróides. Monoterpenos representaram maiores porcentagens em plantas infectadas, do que nas saudáveis, exceto no tipo Sybilla. O mirceno foi o principal monoterpeno encontrado. O α -humuleno foi o segundo composto mais abundante em quatro cultivares, com exceção do Marynka que apresentou maior teor de (E)- β -farneseno. Concluiu-se que a infecção dos cones de lúpulo não interferiu de forma significativa na síntese de metabólitos secundários da planta.

VIEJO et al. (2019) compararam os compostos de aroma encontrados em 24 cervejas obtidas por três tipos distintos de fermentação (alta, baixa e espontânea). De forma geral, as fermentações espontânea e alta apresentaram mais compostos voláteis que a baixa (espontânea>alta>baixa). Foi evidenciada a presença dos compostos caproato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, laurato de etila e álcool fenilético em todos os tipos de fermentação. As cervejas de baixa fermentação não apresentaram compostos voláteis oriundos do lúpulo, em contra partida β -pineno, linalol, humuleno e geranato de metila foram encontrados em algumas cervejas de alta fermentação e p -pineno, linalol, geranato de metila e humuleno foram encontrados em cervejas de fermentação espontânea. As cervejas de alta fermentação apresentaram compostos de aroma frutado (maçã e abacaxi) e floral (rosas). As de baixa fermentação apresentaram mais compostos de aroma frutado (maçã, uva e abacaxi), enquanto que a fermentação espontânea também originou compostos de aroma frutado, onde além dos já citados, foram encontrados compostos de aroma de cereja (benzaldeído, *o*-tolualdeído, benzoato de etila).

Em um estudo realizado por GIANNETTI et al. (2019) foi traçado um perfil de compostos de aroma presentes em 79 cervejas de inúmeros países, todas do estilo pilsen (lager), onde 42 foram artesanais e 37 comerciais. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma impressão digital molecular das cervejas, a fim de diferenciar as cervejas artesanais de suas concorrentes, assim como evitar fraudes em sua produção. Identificou-se 111 compostos voláteis com a análise de todas as amostras, onde ésteres e terpenos constituíram as principais classes dos compostos de aroma, os quais são originados dos processos fermentativos. As cervejas comerciais possuíam menores teores de ésteres e terpenos, quando comparados as artesanais, fato que pode ser explicado pelos processos térmicos que estas bebidas passam ao decorrer de sua fabricação, como a pasteurização. Com base nestes resultados, foi possível identificar substâncias que mais contribuem para a diferenciação das classes de cerveja, onde as cervejas artesanais são caracterizadas por um maior teor de octanoato de etila, decanoato de etila e β -linalol, enquanto as comerciais possuem maiores teores de acetato de 3-metilbutila, 2-metilpropila 2-metilpropanoato, hexanoato de etila, 2-feniletanol, ácido octanóico e acetato de 2-feniletil.

A variação do cereal utilizado na confecção do malte da cerveja pode interferir diretamente no teor e tipos de metabólitos encontrados na bebida.

BETTENHAUSEN et al (2018) investigaram a influência de seis fontes de malte, originados de duas linhagens de cevada, sobre a química da cerveja produzida, além de observar se os produtos obtidos afetariam atributos sensoriais, como o sabor. Os metabólitos da cerveja foram semelhantes aos encontrados nos extratos dos maltes. No total, 852 compostos voláteis foram identificados. Tanto os compostos voláteis, quanto os não voláteis variaram de acordo com o genótipo da cevada, assim como com sua localização de plantio. As análises mostraram características sensoriais de cada fonte, onde: Full Pint e Copeland foram associados às características sensoriais frutados, casca de melancia, acetato de etila, acetato de isoamil e acetaldeído / maçã verde; Meredith e Metcalfe foram associados às características sensoriais dos grãos de milho, sulfídicos (H₂S) e favos de mel; PolarStar e Expedition foram associado a sabor umami. Os perfis de sabores frutados e chips de milho foram associados a purinas / pirimidinas, cetonas voláteis, aminas e fenólicos e lipídios, sacarídeos, fenóis, aminas e alcalóides.

Com o objetivo de melhorar as características sensoriais da cerveja, através da adição de novas matérias primas em seu processo de fabricação, ZAPATA et al (2019) analisaram o perfil de voláteis de cervejas produzidas com 3 cultivares do fruto marmelo. Foram identificados 37 compostos voláteis, dentre os quais o octanoato de etila (originado do processo fermentativo da levedura *Saccharomyces*) se mostrou mais abundante (43%), seguido do álcool feniletílico (13 %), ácido octanóico (10%) e 9-decenoato de etila (6%). Ao comparar com o controle, os compostos orgânicos mais encontrados na bebida de marmelo foram os ésteres, sendo o benzoato de metila e o hexanoato de etila os principais. Os ésteres estão diretamente ligados com o sabor de bebidas fermentadas. Podem ser divididos em ésteres de acetato (acetato de etila, acetato de isoamil e acetato de fenetila) e ésteres de etila (hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila). Estes compostos conferem aroma floral ou frutado ao alimento (ALVIM et al., 2017).

Além dos ésteres, os terpenos também constituem parte dos compostos voláteis presentes na cerveja. Estes são metabólitos secundários originados de varias matérias primas (exemplo lúpulo), assim como das reações de biotransformação de leveduras (MARTINS et al., 2018; PRAET et al., 2015). A composição de terpenos presentes em cervejas pilsen (família lager), foi estudada por MARTINS et al. (2018). Foram identificados 94 compostos mono e sesquiterpênicos voláteis, dentre os quais 34 estavam presentes em todas as

amostras estudadas, sendo β -myrceno, linalol, nerol, β -citronelol, α -terpineol, terpinen-4-ol, geranato de metila, α -cariofileno, τ -cadinol, álcool cariofilênico, e δ -cadineno compostos derivados do lúpulo. Nerol, β -citronelol, linalol, e α -terpineol são compostos derivados das reações de biotransformação de leveduras (KING; DICKINSON, 2003). Alguns compostos como linalol, β -citronelol e α -terpineol, foram determinados com alta repetibilidade. Foi possível agrupar as cervejas em duas categorias, se baseando nos teores de terpenos: microcervejaria e macrocervejaria. As cervejas produzidas em microcervejarias apresentaram mais componentes terpênicos relacionados ao aroma, do que as de macrocervejarias, evidenciando que cervejas artesanais possuem sabor diferenciado das comerciais.

2.7 Análise quimiométrica em cervejas

As ferramentas quimiométricas, como PCA, HCA, PLS, PLS-DA vêm sendo utilizadas na análise discriminatória de cervejas, tanto comerciais quanto artesanais. Uma aplicabilidade importante dessa ferramenta é no auxílio da interpretação de dados relacionados ao estudo químico de compostos fenólicos, voláteis, açúcares e parâmetros físico químicos. Nesse contexto, GIANETTI e colaboradores (2019) utilizaram PLS-DA (Partial least squares discriminat analysis) para estudar o impacto de compostos voláteis na discriminação de cervejas artesanais do estilo pilsen e larger. De forma similar, mas utilizando a análise de PCA, COELHO e colaboradores (2019) realizaram um estudo discriminatório de cervejas artesanais utilizando os compostos voláteis como marcadores para avaliar o impacto da forma de produção e maturação nas características sensoriais desses produtos.

Outra abordagem quimiométrica que tem sido reportada para a análise exploratória de metabólitos ativos e categorização de cervejas com base em seus estilos é a Análise Discriminante Linear (LDA-Linear Discriminant Analysis), similar a análise de PCA. Nesse sentido, um recente estudo desenvolvido por CHEIRAN e colaboradores (2019) realizou a identificação de compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e compostos nitrogenados (poliaminas e espermidinas) em cervejas artesanais. Com o auxílio da LDA foi possível agrupar as cervejas em estilos com base na análise discriminatória.

O uso de ferramentas quimiométricas pode auxiliar também no estudo da influência de ingredientes utilizados na fabricação de cervejas nas características químicas e sensoriais. Recentemente, BETTEBHAUSEN e colaboradores (2018)

investigaram a influencia do tipo de malte (genótipo e fabricante) na composição química e sensorial de cervejas. Os resultados das análises cromatográficas seguida da análise quimiométrica utilizando PCA sugeriram que a fonte de malte afetava de forma significativa a composição química (compostos voláteis e não voláteis) e sensoriais (teor de compostos relacionados ao aroma e sabor) das cervejas, demonstrando que a variação do tipo de um mesmo ingrediente tem impacto direto sobre a composição química e conseqüentemente afetariam as suas propriedades sensoriais e o potencial funcional desses produtos fermentados.

Tendo em vista a aplicabilidade desta técnica, o uso da quimiometria pode contribuir para a interpretação de dados de composição química de cervejas, verificar correlações entre os componentes destas bebidas e as propriedades apresentadas por esses compostos, bem como auxiliar na discriminação delas em grupos baseadas nos estilos, tipos e matérias-primas utilizadas na fabricação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a caracterização físico-química e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de cervejas adicionadas de matérias-primas amazônicas.

3.2 Específicos

- Determinar as características físico-químicas: pH, cor, teor de sólidos totais das cervejas;
- Avaliar atividade antioxidante das cervejas através dos ensaios de DPPH, ABTS, Fenóis Totais e Flavonoides Totais;
- Caracterizar o perfil de mono e oligossacarídeos das cervejas através de Cromatografia Líquida de Troca Iônica com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD);
- Caracterizar o perfil químico das amostras de cerveja através de Espectrometria de Massas com fonte de ionização por *Electrospray* (ESI-MS);
- Utilizar ferramentas quimiométricas para discriminação das cervejas com base na sua composição química.

44. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Inicialmente, um total de 15 cervejas produzidas na região norte foram selecionadas. Deste total, 11 continham ingredientes amazônicos, como: erva-chama, bacuri, camu-camu, açaí, pripioca, puxuri, cupulate, taperebá, aração-boi e jambú; e 4, dos tipos ale e lager, foram usadas como controle. Todas foram adquiridas em mercados locais das cidades de Manaus e Belém. Previamente aos estudos práticos, foram retirados 50 mL de cada amostra, desgaseificadas por processo de sonicação durante 5 min. e armazenadas em freezer até a realização dos ensaios analíticos. As análises foram realizadas em triplicata, com três amostras distintas de cada tipo de cerveja (três frascos de cada; n=45).

4.2 Determinação das características físico-químicas

Foram realizados ensaios para determinação do pH, sólidos totais, açúcares e cor, das cerveja, segundo as metodologias descritas abaixo.

4.2.1 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados utilizando um pHmêtro Digimed modelo DM-22 (EBC, 2005).

4.2.2 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado com auxílio de um refratômetro (EBC, 2005).

4.2.3 Caracterização do perfil de mono- e oligossacarídeos por HPAEC-PAD (Cromatografia Líquida de Troca Iônica com Detecção Amperométrica Pulsada)

A análise de açúcares e oligossacarídeos (malto-oligossacarídeos e frutooligossacarídeos) nas amostras foi realizada por Cromatografia de Troca Aniônica de Alto Desempenho acoplada à Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD) usando um cromatógrafo de íons Dionex ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com o método descrito por Pereira, Arruda, de Moraes, Eberlin e Pastore (2018), com algumas modificações. Os açúcares (xilitol, manitol, sorbitol, ramnose, arabinose, glicose, frutose e sacarose) foram separados por eluição isocrática usando NaOH 0,12 M em uma coluna

Carbopac PA1 (250 × 4 mm id, tamanho de partícula 10 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Em contraste, os malto-oligossacarídeos (G2-G7) e os frutooligossacarídeos (GF2-GF4) foram separados por eluição gradiente usando NaOH 0,1 M (solução A) e acetato de sódio 0,5 M contendo NaOH 0,1 M (solução B) em um Carbopac PA100 coluna (250 × 4 mm id, tamanho de partícula 8,5 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O gradiente foi realizado da seguinte forma: 0-2 min, 3% de B; 2-18 min, 3-40% de B; 18-23 min, 100% de B; e 23-28 min, 3% B. Em ambas as análises, as amostras foram filtradas através de um filtro de PTFE de 0,22 µm, diluídas em água ultrapura e injetadas na coluna usando um auto-amostrador. A temperatura da coluna foi mantida a 30 ° C, a vazão foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção das amostras foi de 25 µL. Os dados foram adquiridos e processados no software Chromeleon versão 7.0. Os açúcares e oligossacarídeos foram identificados nas amostras comparando os tempos de retenção dos padrões autênticos e as amostras. As curvas de calibração foram construídas com padrões comerciais (0,25-12,50 µg /mL) para quantificar os açúcares / oligossacarídeos nas amostras. O conteúdo de açúcares e oligossacarídeos individuais foi expresso em µg/mL de amostra (Pereira et. al, 2018). Foi realizada a análise multivariada dos dados através do software Chemoface, versão 1.5.

4.2.4 Análise de cor

A análise de cor das amostras baseou-se no sistema CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage-CIE), o qual consiste na percepção de cores humanas em três dimensões ou direções do espaço de cores. O eixo L* representa claridade/escurecimento; a* representa as tonalidades de vermelho a verde; b* representa tonalidades de amarelo a azul; C* representa o croma (intensidade da cor); e h* o ângulo da matriz.

Portanto, a cor (L *, a * b) das cervejas foi analisada em espectrocolorímetro (Hunter, modelo ColorQuest XE, Reston, VA, EUA), utilizando uma abertura de medição de 1 x 10⁻³ m. e cubeta de 3 mL (1cm de comprimento), equipada com fonte de luz D65 e um ângulo de observação de 10°. Foi utilizado o modo de reflexão especular por refletância (RSIN), que mede a refletância total, incluindo refletância difusa e refletância especular (NERI-NUMA et al., 2018).

4.3 Avaliação da capacidade antioxidante

4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH•

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH foi realizada segundo metodologia previamente descrita, com modificações (LÍLIAN et al., 2019). Preparou-se uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH em etanol. Em seguida, adicionou-se 270 µL desta solução juntamente com 30 µL da amostra, Trolox ou controle (DMSO) nos poços da microplaca. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com ausência de luz, seguindo com a leitura em 492 nm no leitor de microplaca (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). O procedimento anterior foi repetido com as diluições seriadas das amostras e do trolox (40mM), a fim construir suas respectivas curvas de calibração para posteriores cálculos de equivalência. A análise foi realizada em triplicata e os resultados finais foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox (TE) por litro de cerveja (mmol TE L⁻¹).

4.3.2 Atividade sequestrante do radical ABTS•

A fim de determinar a atividade antirradical ABTS• o ensaio foi realizado segundo o método descrito por SHANTY (2017). Inicialmente, preparou-se a solução de ABTS• 0,7 mM em 5mL de água deionizada e 5mL de persulfato de potássio 2,4 mM. Em seguida, a mistura reacional foi incubada em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obter uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Adicionou-se 270 µL desta solução juntamente com 30 µL da amostra, Trolox ou controle (DMSO) nos poços da microplaca, incubando por 15 minutos com ausência de luz. Procedeu-se com a leitura em leitor de microplaca a 620nm (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). O procedimento anterior foi repetido com as diluições seriadas das amostras e do Trolox (40mM), a fim construir suas respectivas curvas de calibração para posteriores cálculos de equivalência. A análise foi realizada em triplicata e os resultados finais foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox (TE) por litro de cerveja (mmol TE L⁻¹).

4.3.3 Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais foi realizada segundo metodologia previamente descrita, com modificações (HORSZWALD; ANDLAUER, 2011). Iniciou-

se com a incubação por 8 minutos, em temperatura ambiente, de 10 µL da amostra e 50 µL de FolinCiocalteu 50%. Após este tempo, adicionou-se 240 µL de Carbonato de sódio e incubou-se por 3 minutos. Realizou-se a leitura da absorbância em leitor de microplaca, a 740nm (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). Foram realizadas diluições seriadas das amostras e do ácido gálico (1mg/mL), a fim construir suas respectivas curvas de calibração para posteriores cálculos de equivalência. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de cerveja (mg GAE L⁻¹).

4.3.4 Flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada, segundo SINGLETON e ROSSI (1965), com modificações. Foram adicionados 30µL de amostra, quercetina ou controle (etanol) a 90µL de etanol 95%. Após, foram adicionados 6µL de cloreto de alumínio a 10% e 6µL de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, foram adicionados 168µL de água destilada seguindo com incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Realizaram-se diluições seriadas das amostras e da quercetina (1mg/mL), a fim construir suas respectivas curvas de calibração para posteriores cálculos de equivalência. A determinação da absorbância foi feita em leitor de microplaca, a 405nm (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de Quercetina por litro de cerveja.

4.4 Análise do perfil químico por Espectrometria de Massas com ionização por *Electrospray* (ESI-MS)

Previamente, as amostras sofreram um processo de purificação através da técnica de extração em fase sólida (SPE). Inicialmente, 1 mL de cada cervejas foi passado através de uma coluna contendo 5g da fase KP-18-HS (Biotage, VA, EUA) previamente ativado com metanol (1 mL) e condicionado com água (1 mL). A coluna foi lavada com água (3 mL) e ainda eluída com metanol HPLC (3 mL). As frações metanólicas, obtidas no final do processo, foram diluídas em metanol na proporção de 1:10. A análise se deu por infusão direta de uma alíquota das diluições em espectrômetro de massa. Todos os espectros foram adquiridos por modo de monitoramento contínuo (aplicativo Thermo LCQ Fleet Tune) usando espectrômetro

de massa de captura de íons LCQ Fleet (Thermo LCQ Fleet, San Jose, CA, EUA), com interface de ionização por electropulverização (ESI), em modo de íon negativo para executar ESI-MS e análises ESI-MSn. Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 varreduras por espectro. As amostras foram infundidas diretamente na fonte de íons através da bomba de seringas do instrumento (10 $\mu\text{L min}^{-1}$). As condições analíticas da MS foram: tensão de pulverização, 5 kV; bainha de gás, 10 arb; gás auxiliar, 5 arb; gás de varredura, 0 arb; temperatura capilar, 200 ° C; tensão capilar, 40 V; lente de tubo, 115 V; faixa de massa, m / z 100 a 1000. O hélio foi usado como gás de colisão e os espectros ESI-MSn foram obtidos usando energias de colisão variando de 20 a 30% (SILVA et al., 2016).

4.4.1 Análise quimiométrica

A análise multivariada foi realizada através do software Chemoface, versão 1.5. Íons com intensidade abaixo de 10% em relação ao pico base, em cada espectro de massa, foram negligenciados durante a análise dos dados (LÍLIAN et al., 2019).

4.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, podendo-se calcular a média \pm desvio padrão dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades físico-químicas

Devido à diversidade de tipos e estilos de cerveja existentes, faz-se necessária a caracterização físico-química desses produtos, tanto para classificá-los, enquadrando-as em grupos, quanto para manter os padrões de qualidade ao longo de sua produção. A determinação de algumas propriedades, como IBU e teor alcoólico, torna mais fácil a escolha do consumidor no momento da aquisição do produto, pois estão diretamente relacionadas ao seu sabor.

As cervejas analisadas neste trabalho apresentaram distintas características físico-químicas devido a complexidade de ingredientes utilizados no processo de fabricação, além de serem de diferentes tipos e estilos. Contudo, ao avaliar a faixa de pH obtido (4,21 a 5,73), as amostras seguiram um padrão, podendo ser classificadas como ácidas (tabela 2). O pH da cerveja é uma variável importante a ser analisada, pois está diretamente ligado a estabilidade da bebida durante seu processo de envelhecimento. Quando abaixo de 4, a bebida pode ter um sabor mais ácido, amargo e seco, podendo deixar gosto residual metálico no paladar. Contudo, se o pH estiver acima deste valor, essas características mudam para um sabor mais tostado, podendo também reduzir a oxidação da bebida a longo prazo evitando a formação de produtos, como o trans-2-nonenal (que confere sabor de papelão), b-damascenona (sabor de maçã cozida) e dimetiltrissulfeto (sabor de repolho) (GUYOT-DECLERCK et. al, 2004).

Através da determinação do teor de sólidos totais não foi possível distinguir as amostras controle das que continham ingredientes amazônicos, sendo a amostra ABE (erva-chama) a que apresentou maior valor (9,8 °Brix) e a amostra ABT (taperebá) menor valor (4,2° Brix). O percentual de graus Brix deve ser relacionável com os resultados obtidos na mensuração de açúcares, contudo a medição de sólidos solúveis representa todos os solutos presentes na mistura, sendo os açúcares compostos majoritariamente medidos, podendo conter também ácidos orgânicos, sais entre outros. É a escala Brix que mensura quantos gramas de açúcar tem a cada 100 g da mistura inteira (LIMA et. al, 2011).

Tabela 2- Características físico-químicas das cervejas

N°	Código das amostras	Tipo	IBU	Álcool (% v/v)	Ingrediente amazônico	Origem	pH	Sólidos Totais (°Brix)
1	BJB	Ale	18	5,1	Jambú	Manaus	5,73	5,6
2	ABB	Lager	14	3,8	Bacuri	Pará	4,21	5
3	ABPU	Ale	32	6,2	Puxuri	Pará	4,28	5,8
4	ABC	Lager	30	5,9	Camu-camu	Pará	4,34	8,2
5	ABT	Ale	15	4,7	Taperebá	Pará	4,21	4,2
6	ABA	Ale	30	7,2	Açaí	Pará	4,33	9,1
7	ABP	Ale	32	6,0	Priprioca	Pará	4,6	8,4
8	ABE	Ale	73	8,3	Erva-chama	Pará	4,52	9,8
9	ABL	Lager	23	4,8	S/IA	Pará	4,54	6
10	ABPL	Lager	10	3,9	S/IA	Pará	4,63	5
11	TBC	Ale	45	5,5	Bacuri	Manaus	5,64	6,8
12	TBM	Ale	13	4,5	Araçá-Boi	Manaus	5,05	6
13	TBG	Lager	30	4,7	Cupulate	Manaus	5,17	6,8
14	TBWI	Ale	50	5,7	S/IA	Manaus	5,18	6,2
15	TBT	Lager	12	4,5	S/IA	Manaus	5,20	5,2

Com a análise de cor, foi possível observar que estas variaram entre si, sendo ABT e ABPL as cervejas mais claras e ABA e ABC as mais escuras (tabela 3). A literatura relata que inúmeros compostos, como polifenóis e melanoidinas, estão diretamente ligados à cor final da cerveja. Entretanto, fatores como pH, temperatura e tipo de grão utilizado, interferem fortemente sobre essa variável (FREGUEDO et. al, 2009). A cevada que é o principal grão utilizado na fabricação de cervejas, possui poucos pigmentos corantes, necessitando passar pelo processo de maltagem para o desenvolvimento desses pigmentos. Uma das principais reações que acontecem durante a maltagem é a reação de Maillard, que consiste em um escurecimento não enzimático dependente de temperatura (SHELHAMMER, 2009). Cervejas mais escuras podem apresentar maior atividade antioxidante in vitro, quando comparadas com as mais claras, justamente pelo maior teor de melanoidinas e/ou compostos como as antocianinas presentes em algumas matérias-primas utilizadas na fabricação (FREGUEDO et. al, 2009).

Tabela 3- Análise de cor das cervejas através do sistema CIELAB

Amostras	L* (lightness)	C* (chroma)	h* (hue angle)	a* (red/green)	b* (yellow/blue)
ABE	4,8 ± 0,23	5,42 ± 0,22	72,76 ± 1,73	1,61 ± 0,22	5,17±0,16
ABB	4,77 ± 0,87	3,7 ± 0,98	102,67 ± 1,54	-0,80 ± 0,16	3,61±0,97
ABC	1,71 ± 0,02	1,58 ± 0,08	67,81 ± 2,81	0,60 ± 0,10	1,46±0,05
ABP	4,09 ± 0,13	5,15 ± 0,21	57,46 ± 1,75	2,77 ± 0,09	4,34±0,25
ABT	18,25 ± 1,06	2,92 ± 0,46	88,98 ± 3,0	0,04 ± 0,17	2,92 ± 0,46
ABPU	5,44 ± 0,39	5,81 ± 0,34	86,4 ± 0,97	0,37 ± 0,12	5,8 ± 0,33
ABL	2,28 ± 0,06	1,83 ± 0,12	92,51 ± 1,60	-0,08 ± 0,05	1,83 ± 0,12
ABA	1,08 ± 0,03	0,68 ± 0,05	70,36 ± 3,87	0,23 ± 0,04	0,65 ± 0,06
ABPL	17,94 ± 1,04	1,81 ± 0,28	94,71 ± 10,26	-0,11 ± 0,27	1,79 ± 0,32
TBT	3,44 ± 0,19	1,1 ± 0,15	103,54 ± 2,59	-0,26 ± 0,08	1,04 ± 0,14
BJB	3,60 ± 0,11	2,17 ± 0,30	88,89 ± 1,39	0,05 ± 0,06	2,17 ± 0,30
TBC	3,47 ± 0,20	2,28 ± 0,46	78,45 ± 3,45	0,44 ± 0,06	2,23 ± 0,48
TBG	3,35 ± 0,43	1,98 ± 0,28	98,20 ± 4,46	-0,27 ± 0,14	1,95 ± 0,30
TBWI	2,77 ± 0,23	0,62 ± 0,26	109,38 ± 1,10	-0,21 ± 0,09	0,58 ± 0,25
TBM	6,33 ± 0,15	2,77 ± 0,31	102,16 ± 1,55	-0,59 ± 0,13	2,71 ± 0,29

O perfil de mono e oligossacarídeos, ilustrado na tabela 4, foi determinado através da pesquisa de 17 açúcares. A amostra ABB (bacuri) foi a que apresentou maior teor de açúcares totais com 15960,45±417.09 µg/mL, sendo os monossacarídeos a classe mais abundante, representando um total de 8786,74±313.03 µg/mL, destacando-se a glicose com teor de 4339.47±164.66 µg/mL. Já a amostra que apresentou menor teor de açúcares foi a ABPL, um dos controles utilizados, com um total de 3128,79±265,65 µg/mL. Sendo os malto-oligossacarídeos a classe mais abundante, representando um total de 2218.11±300.72 µg/mL, com destaque para a maltotetraose 734.86±255.70 µg/mL.

Com exceção das amostras ABPU, ABB, ABT e ABP, todas as demais obtiveram valores de oligossacarídeos maiores que de monossacarídeos, sendo a amostra ABE a mais rica em oligossacarídeos (fruto-oligossacarídeo 1456.93 ± 47.63 µg/mL e malto-oligossacarídeos 11143.05±278.02 µg/mL) e segunda mais rica em açúcares totais. Oligossacarídeos são cadeias de açúcares formadas por monossacarídeos. Estes podem exercer atividade prebiótica, uma vez que servem de alimento para micro-organismos colonizadores do cólon intestinal. O resultado da fermentação desses açúcares é a acidificação do conteúdo fecal, através da síntese de ácidos graxos de cadeia curta responsáveis por desempenhar funções em

tecidos, na regulação celular, na estimulação do crescimento de lactobacilos e bifidobactérias que inibem a proliferação de bactérias patogênicas (MILLANI;KONSTANTYNER; TADDEI, 2009; SHIMIZU, 2011).

Através análise quimiométrica, foi possível agrupar as cervejas em três grupos bem definidos, como ilustrado na figura 9A. O grupo 1 representado pelas amostras ABP e ABT; grupo 2 por ABE; e grupo 3 pelas demais amostras. Ao observar a figura 9B, notam-se quais açúcares estão sendo responsáveis por agrupar as amostras. O grupo 1 tem como componente principal a glicose; o grupo 2 tem como componente principal a 1F- β -frutofuranosilnístose; já o grupo 3 foi representado pelos açúcares maltose, maltotriose e frutose.

Figura 11. Análise do perfil de açúcares das cervejas. **A)** Score plot PC 1, 2 e 3; **B)** Biplot PC 1, 2 e 3

hidrolizando o amido a açúcares fermentáveis, tais como glicose, maltose e maltotriose. Contudo, açúcares não fermentáveis também são gerados, podendo alterar as características organolépticas da cerveja (ALMEIDA et. al 2018).

O mosto é rico em açúcares fermentescíveis, sendo a maltose o açúcar mais abundante, seguida pela maltotriose. Entretanto, outras fontes de açúcares são utilizadas para enriquecer o mosto (xaropes de glicose, de milho, amido do trigo). A ordem de fermentação das leveduras varia dependendo do açúcar, primeiro a levedura consome a sacarose, seguida pela glicose, maltose e, por fim, a maltotriose. Oligômeros de alto peso molecular permanecem inalterados ao final do processo de fermentação (FERREIRA, 2009; LEI et. al, 2016).

A cerveja obtida após seus respectivos processos de fabricação, possui em sua composição tanto açúcares fermentescíveis residuais quanto açúcares de maior peso molecular, como as dextrinas. Estes teores podendo variar de 20 a 30g de açúcar por litro de cerveja, dependendo do estilo e fabricante. São exemplos dos açúcares encontrados nesta bebida: os monossacarídeos glicose, frutose, ribose, arabinose, vilose, manose e galactose; os dissacarídeos maltose, sacarose, isomaltose, trealose e xylobiose; e os oligossacarídeos 4- α -IsomaltosilD-maltose, maltotetraose, maltotriose, maltopentose, maltohexose, estaquiase, kestose. (FERREIRA, 2009).

Tabela 4. Composição de açúcar ($\mu\text{g/mL}$) em diferentes cervejas

Açúcares	Código	Amostras						
		TBWI	TBC	TBT	TBG	BJB	TBM	ABP
Xilitol	Xyl	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.
Manitol	Man	32.83 \pm 1.02	39.68 \pm 0.19	15.87 \pm 1.25	28.39 \pm 1.21	30.17 \pm 0.18	14.26 \pm 0.27	31.04 \pm 0.42
Sorbitol	Sor	46.33 \pm 1.41	75.76 \pm 2.08	25.06 \pm 1.17	57.15 \pm 1.11	72.09 \pm 1.50	44.58 \pm 2.98	177.41 \pm 8.09
Total alcoóis de açúcar	TSA	79.16\pm1.98	115.43\pm2.05	40.93\pm2.21	85.53\pm0.26	102.26\pm1.35	58.85\pm3.23	208.45\pm8.32
Rhamnose	Rha	5.03 \pm 1.24	48.35 \pm 1.73	2.24 \pm 0.74	24.35 \pm 1.08	6.80 \pm 0.81	t.r.	16.40 \pm 0.22
Arabinose	Ara	112.83 \pm 5.55	112.69 \pm 1.42	43.71 \pm 5.62	80.51 \pm 3.32	110.08 \pm 11.46	63.34 \pm 3.22	101.28 \pm 1.84
Glicose	Glu	202.87 \pm 1.47	413.54 \pm 11.55	198.79 \pm 14.92	244.60 \pm 9.78	374.89 \pm 10.78	216.32 \pm 1.05	937.36 \pm 39.74
Frutose	Fru	54.55 \pm 4.13	92.00 \pm 5.61	110.63 \pm 3.13	71.74 \pm 2.76	307.70 \pm 14.18	134.79 \pm 2.96	181.17 \pm 5.00
Total monossacarídeos	TMS	375.29\pm9.11	666.58\pm15.29	355.37\pm21.60	421.20\pm8.69	799.47\pm32.60	414.45\pm4.54	1236.21\pm41.44
Sacarose	Suc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1-Kestose	GF ₂	t.r.	10.85 \pm 5.04	t.r.	4.76 \pm 1.70	t.r.	t.r.	6.50 \pm 1.61
Nistose	GF ₃	30.20 \pm 4.47	307.50 \pm 7.91	270.70 \pm 22.16	427.03 \pm 17.74	93.66 \pm 29.22	205.28 \pm 2.42	359.63 \pm 28.27
1F- β -frutofuranosilnístose	GF ₄	479.50 \pm 53.08	637.91 \pm 30.29	346.54 \pm 15.04	529.30 \pm 15.24	732.92 \pm 13.86	431.09 \pm 55.60	638.78 \pm 9.05
Total fruto-oligossacarídeo	TFOS	509.69\pm57.53	956.26\pm37.43	617.24\pm37.12	961.09\pm22.11	826.58\pm42.91	636.38\pm57.39	1004.91\pm31.38
Maltose	G ₂	890.78 \pm 37.52	911.62 \pm 194.52	68.27 \pm 40.64	97.19 \pm 67.82	1854.59 \pm 116.88	368.59 \pm 112.27	338.15 \pm 27.10
Maltotriose	G ₃	253.07 \pm 61.77	744.91 \pm 57.35	163.51 \pm 53.30	500.37 \pm 58.86	1017.02 \pm 539.09	756.53 \pm 292.86	1550.71 \pm 43.46
Maltotetraose	G ₄	1091.27 \pm 385.01	2325.97 \pm 401.52	2229.60 \pm 30.18	1874.93 \pm 172.17	312.59 \pm 178.02	1430.60 \pm 620.32	2332.82 \pm 130.76
Maltopentaose	G ₅	320.90 \pm 111.33	881.24 \pm 142.85	831.63 \pm 7.36	645.48 \pm 35.55	t.r.	515.55 \pm 237.60	874.13 \pm 52.02
Maltohexaose	G ₆	316.16 \pm 108.00	928.88 \pm 142.83	894.24 \pm 11.82	756.28 \pm 69.40	n.d.	637.70 \pm 262.34	758.30 \pm 54.83
Maltoheptaose	G ₇	318.17 \pm 110.19	436.83 \pm 78.74	602.46 \pm 2.94	460.50 \pm 43.52	t.r.	507.66 \pm 199.58	394.39 \pm 32.02
Total malto-oligossacarídeos	TMOS	3190.36\pm743.02	6229.44\pm630.63	4789.70\pm132.94	4334.76\pm194.21	3184.21\pm620.52	4216.62\pm1500.44	6248.51\pm303.81
Total de açúcares	TS	4154.51\pm695.11	7967.72\pm595.62	5803.24\pm150.65	5802.58\pm198.80	4912.52\pm587.69	5326.29\pm1439.93	8698.07\pm312.37

Tabela 4. (continuação) Composição de açúcar ($\mu\text{g/mL}$) em diferentes cervejas

Amostras							
ABL	ABB	ABE	ABC	ABPU	ABT	ABPL	ABA
t.r.	t.r.	6.61 \pm 0.31	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.	t.r.
31.16 \pm 1.15	18.10 \pm 0.11	54.81 \pm 1.43	23.49 \pm 0.32	22.34 \pm 1.23	9.87 \pm 1.23	18.46 \pm 0.38	16.58 \pm 0.73
41.10 \pm 3.25	195.95 \pm 5.20	74.95 \pm 3.01	84.69 \pm 2.08	49.89 \pm 1.12	31.62 \pm 1.77	25.56 \pm 0.35	72.77 \pm 2.25
72.26\pm4.28	214.05\pm5.13	136.37\pm4.58	108.18\pm2.11	72.23\pm2.35	41.49\pm0.75	44.03\pm0.35	89.34\pm2.97
1.86 \pm 0.48	t.r.	15.99 \pm 0.43	38.96 \pm 0.61	12.33 \pm 0.61	0.76 \pm 0.44	t.r.	41.13 \pm 2.11
50.88 \pm 0.93	42.67 \pm 2.71	134.65 \pm 0.38	84.94 \pm 2.76	55.39 \pm 2.07	18.97 \pm 2.60	24.66 \pm 16.88	65.14 \pm 3.83
272.34 \pm 16.63	4339.47 \pm 164.66	545.07 \pm 20.94	300.88 \pm 15.41	10651.46 \pm 700.99	9491.32 \pm 475.98	145.56 \pm 2.22	268.09 \pm 11.63
177.88 \pm 6.90	4404.59 \pm 151.99	129.65 \pm 6.68	127.90 \pm 8.61	359.62 \pm 23.43	769.95 \pm 38.30	98.36 \pm 47.26	160.64 \pm 7.06
502.97\pm23.48	8786.74\pm313.03	825.37\pm26.92	552.69\pm23.08	11078.80\pm714.08	10280.99\pm514.52	268.58\pm64.64	534.99\pm21.74
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
t.r.	t.r.	3.70 \pm 1.24	29.86 \pm 5.95	t.r.	t.r.	t.r.	8.98 \pm 3.53
319.28 \pm 6.20	259.13 \pm 7.67	580.26 \pm 18.77	260.52 \pm 3.93	159.13 \pm 9.49	322.97 \pm 20.52	219.47 \pm 32.87	144.17 \pm 19.72
366.15 \pm 14.96	258.48 \pm 13.66	872.97 \pm 37.26	568.80 \pm 19.55	393.08 \pm 32.43	922.54 \pm 65.92	378.61 \pm 70.01	594.26 \pm 101.68
685.43\pm14.03	517.61\pm18.95	1456.93\pm47.63	859.17\pm17.82	552.21\pm36.60	1245.52\pm85.75	598.08\pm102.53	747.42\pm122.94
218.05 \pm 27.33	199.95 \pm 15.28	5462.58 \pm 244.16	320.60 \pm 152.21	12.07 \pm 2.54	81.97 \pm 7.77	431.01 \pm 247.15	1120.46 \pm 426.21
623.22 \pm 46.25	916.12 \pm 34.99	3719.96 \pm 72.88	2491.46 \pm 201.37	4.39 \pm 1.15	8.94 \pm 0.51	188.64 \pm 10.22	632.07 \pm 75.43
2972.43 \pm 96.04	2670.37 \pm 58.15	1879.88 \pm 57.26	2044.25 \pm 122.89	8.90 \pm 1.74	15.27 \pm 6.36	734.86 \pm 255.70	1831.36 \pm 793.86
1016.83 \pm 27.12	984.69 \pm 5.25	76.02 \pm 4.91	831.60 \pm 17.54	n.d.	n.d.	335.94 \pm 85.43	820.32 \pm 270.97
1014.71 \pm 4.41	973.95 \pm 23.38	4.62 \pm 1.61	1086.50 \pm 63.91	n.d.	n.d.	323.66 \pm 108.37	825.52 \pm 261.30
613.93 \pm 9.29	696.97 \pm 11.08	t.r.	850.64 \pm 65.95	n.d.	n.d.	203.99 \pm 79.62	500.92 \pm 159.30
6459.16\pm152.31	6442.05\pm98.00	11143.05\pm278.02	7625.05\pm308.26	25.36\pm4.61	106.19\pm10.93	2218.11\pm300.72	5730.65\pm1133.87
7719.83\pm186.57	15960.45\pm417.09	13561.73\pm309.15	9145.10\pm316.85	11728.61\pm739.30	11674.19\pm601.58	3128.79\pm265.63	7102.41\pm1018.00

t.r.: traço; n.d.: não detectado, abaixo do limite detecção do método.

5.2 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante da cerveja está relacionada, em sua maioria, à presença de compostos fenólicos oriundos do malte e do lúpulo. Contudo, as adições de novos ingredientes, durante as etapas de produção da bebida, também podem contribuir para o aumento desta atividade. A análise do potencial antioxidante da cerveja é importante não só para correlacionar com determinados compostos frequentemente encontrados em sua composição, mas também para poder estimar os possíveis benefícios de seu consumo.

Antioxidantes são classificados como compostos que possuem a capacidade de retardar e/ou prevenir a oxidação de determinado substrato. Este composto precisa ter substituintes doadores de elétrons ou hidrogênio, capacidade de deslocamento do radical formado, ser quelante de metais, além de conseguir atividade em sítios lipo e hidrofílicos. Entre os principais antioxidantes de origem natural estão a vitamina C, compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis (SHAHIDI, 1996).

Para avaliar a atividade antioxidante das cervejas foram utilizados diferentes ensaios, os quais tiveram seus resultados ilustrados na tabela 5. No geral, as amostras apresentaram melhor atividade antioxidante no ensaio de ABTS, quando comparado a ensaio DPPH. Segundo SOUSA et al. (2007), a porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH e ABTS consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH/ABTS em 50% é denominada concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo destes reagentes por uma amostra, menor será a sua CI50, portanto maior a sua atividade antioxidante. O ensaio de DPPH costuma ser utilizado quando as substâncias antioxidantes são mais solúveis em solventes orgânicos, enquanto o ensaio de ABTS tem a vantagem de poder ser utilizado para amostras tanto de caráter hidrofílico quanto lipofílico (SUCUPIRA et. al, 2012).

Partindo deste princípio, podemos observar que a amostra ABC (camu-camu) foi a que apresentou maior atividade antioxidante tanto no ensaio de DPPH quanto ABTS, apresentando inibição de $5,15 \pm 1,60$ mmol/L equivalentes de trolox e $12,66 \pm 0,13$ equivalentes de trolox, respectivamente. A alta atividade da amostra ABC pôde ser relacionada com seus altos teores de fenóis totais ($308,80 \pm 2,84$ mg/L eq. ácido gálico) e flavonoides ($222,29 \pm 1,02$ mg/L eq. quercetina). Nos últimos anos, o camu-

camu tem sido amplamente estudado devido seus altos teores de vitamina C (4000 mg/ 100g de polpa). Essa vitamina, assim como sua forma oxidada, ácido desidroascórbico, possuem elevada atividade antioxidante (CUNHA-SANTOS et al., 2019). Além do seu alto teor de vitamina C, vitaminas do complexo B e vitamina A, este fruto possui inúmeros fitoquímicos bioativos, incluindo compostos fenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos (CASTRO; MADDOX; IMÁN, 2018).

Tabela 5- Análise da atividade antioxidante das cervejas

Código das amostras	ABTS mmol/L Trolox Eq.	DPPH mmol/L Trolox Eq.	Fenóis Ácido gálico Eq. mg/L	Flavonoides Quercetina eq. mg/L
ABC	12,66 ± 0,13	5,15 ± 1,60	308,80 ± 2,84	222,29 ± 1,02
ABE	11,78 ± 0,01	0,90 ± 0,26	208,10 ± 0,63	83,44 ± 2,45
ABP	10,80 ± 0,22	1,24 ± 0,22	171,31 ± 1,27	114,63 ± 0,08
ABL	9,28 ± 0,21	0,18 ± 0,09	131,17 ± 0,46	50,57 ± 0,50
ABB	8,63 ± 0,15	0,30 ± 0,05	106,71 ± 0,65	40,90 ± 0,45
ABA	8,14 ± 0,44	0,49 ± 0,10	290,12 ± 1,64	199,52 ± 2,04
ABPU	6,35 ± 0,17	0,74 ± 0,14	158,29 ± 0,56	63,03 ± 1,19
ABT	5,83 ± 0,30	0,83 ± 0,01	141,79 ± 0,42	45,06 ± 1,15
TBM	5,69 ± 0,56	0,18 ± 0,05	182,55 ± 0,48	39,13 ± 0,61
TBC	4,50 ± 0,21	0,42 ± 0,07	191,81 ± 0,61	83,78 ± 0,33
TBG	4,07 ± 0,09	0,26 ± 0,03	254,67 ± 3,22	76,08 ± 0,98
BJB	3,84 ± 0,70	0,21 ± 0,07	157,02 ± 0,70	80,71 ± 0,25
ABPL	3,08 ± 0,36	0,30 ± 0,07	83,29 ± 0,30	43,82 ± 0,42
TBWI	2,40 ± 0,18	0,10 ± 0,04	206,33 ± 0,83	57,75 ± 1,18
TBT	2,25 ± 0,31	0,26 ± 0,04	156,86 ± 0,62	38,40 ± 1,08

A segunda amostra que apresentou maior atividade antioxidante no ensaio ABTS foi a ABE (erva-chama) com 11,78±0,01 mmolL eq. trolox, atribuído aos altos teores de fenólicos totais 208,10 ± 0,63 mg/L eq. ácido gálico. A amostra ABP (priprioca) foi a terceira cerveja com maior atividade antioxidante no ensaio de ABTS 10,80±0,22 mmolL eq. trolox e segundo maior valor no ensaio de DPPH 1,24±0,22 mmolL eq. trolox. Estes valores refletem os altos teores de compostos fenólicos encontrados 171,31±1,27 mg/L eq. ácido gálico. As demais amostras acrescidas de ingredientes amazônicos apresentaram resultados promissores de atividade antioxidante, mostrando relação com os ingredientes adicionados conforme os dados descritos na literatura.

Nesse contexto, HERRERA-CALDERON e colaboradores (2018) realizaram um estudo objetivando-se a determinar atividades do extrato etanólico de priprioca (*Cyperus articulatus*), como a atividade antioxidante. O extrato produzido apresentou

o valor 2.28 ± 0.08 , mmol Trolox/g no ensaio ABTS e CI_{50} de 16.9 ± 0.1 mg/mL no ensaio DPPH, com inibição de 75.50% em 26 mg/mL (planta:solvente). Puderam concluir que a boa atividade antioxidante do extrato foi responsável pelo efeito anticonvulsivante da planta. A cerveja adicionada de priprioca obteve valor de $10,80 \pm 0,22$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $1,24 \pm 0,22$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, sendo estes valores maiores que os apresentados no estudo anterior provavelmente devido a complexidade da cerveja, uma vez que esta possui outros compostos antioxidantes provenientes de suas demais matérias-primas.

A fruta açai (*Euterpe precatoria*) é conhecida por seu potencial antioxidante, devido seus altos teores de antocianinas. Logo PEIXOTO e colaboradores (2016) realizaram um estudo com o extrato hidroalcoólico do fruto a fim estudar suas propriedades antioxidantes. No ensaio DPPH obtiveram CI_{50} 3.83 ± 0.04 µg.mg e elevado teor de fenólicos totais 205 mg/L equivalente de ácido gálico. A cerveja adicionada de açai obteve valor de $8,14 \pm 0,44$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $0,49$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, além de teor de fenólicos totais de $290,12 \pm 1,64$ mg/L equivalente de ácido gálico. Os resultados obtidos apresentaram valores maiores que os apresentados no estudo de Peixoto, provavelmente devido a complexidade de compostos fenólicos encontrados na cerveja.

Azevedo e colaboradores (2018) fizeram um estudo com o óleo essencial de puxuri (*Licaria puchury-major*), o qual avaliaram o potencial antioxidante do mesmo. No ensaio de DPPH obtiveram 44,6% de percentual de inibição quando comparado à quercetina; na atividade de eliminação de radicais ABTS obtiveram o valor de $977,3 \pm 25,2$ µM equivalentes de Trolox/ g de óleo essencial. Os autores atribuíram as atividades encontradas a presença de compostos como os fenilpropanos safrole (38,8%) e eugenol (6,1%), e aos monoterpenos, 1,8 -cineol (21,7%), que apresentam importantes propriedades antioxidantes. A cerveja adicionada de puxuri obteve valor de $6,35 \pm 0,17$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $0,74 \pm 0,14$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH. Os valores obtidos foram maiores que os apresentados no estudo de Azevedo, provavelmente devido a complexidade de bioativos encontrados na cerveja.

Cabral e colaboradores (2016) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico do fruto taperebá (*Spondias mombin*) e suas frações obtidas por partição líquido:líquido (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Observaram no ensaio DPPH uma potencial doação de elétrons ou íons H⁺ com valores variando de eliminação de 66% a 76% para todas as amostras testadas. A cerveja adicionada de taperebá obteve valor de $5,83 \pm 0,17$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $0,83 \pm 0,01$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, além de apresentar teor de fenólicos totais de $141,79 \pm 0,42$ mg/L equivalentes de ácido gálico. Em ambos estudos pôde-se observar a boa atividade antioxidante do fruto, podendo ser atribuída ao seu teor de fenólicos totais.

Neri-numa e colaboradores (2013) avaliaram o potencial antioxidante do extrato etanólico do fruto araçá-boi (*Eugenia stipitata*), tendo em vista seus altos teores de vitamina C e compostos fenólicos. Os polifenóis totais foram determinados pelo método de Folin – Ciocalteu e apresentaram valor de $184,05 \pm 8,25$ mg de equivalentes de ácido gálico / 100 g do fruto. A atividade de eliminação de radicais DPPH foi IC₅₀ $0,69 \pm 0,23$ µg / mL. Concluíram o estudo constatando a boa atividade do fruto no combate à radicais livres *in vitro*. A cerveja adicionada de araçá-boi obteve valor de $5,69 \pm 0,56$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $0,18 \pm 0,05$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, além de apresentar teor de fenólicos totais de $182,55 \pm 0,48$ mg/L equivalentes de ácido gálico. Em ambos estudos observou-se a boa atividade antioxidante do fruto, podendo ser atribuída ao seu teor de fenólicos totais.

Pugliese (2010) obervou a atividade antioxidante e teor de fenólicos da semente fresca de cupuaçu e do cupulate, chocolate oriundo da semente do cupuaçu. Constatou que os valores de DPPH e fenólicos totais caem com o processamento da semente, obtendo após processamento inibição do radical DPPH de $8,3 \pm 0,6$ µM/ equivalentes de trolox/g de cupulate e teor de fenólicos totais de 1,8 mg equivalentes de catequina/g de cupulate. A cerveja adicionada de cupulate obteve valor de $4,07 \pm 0,09$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e $0,26 \pm 0,03$ mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, além de apresentar teor de fenólicos totais de $254 \pm 3,22$ mg/L equivalentes de ácido gálico. A maior atividade antioxidante e maior teor de fenólicos totais obtidos neste estudo, podem ser

explicados pela presença de compostos bioativos oriundo das demais matérias-primas da cerveja.

Lalthanpuii e colaboradores (2018) estudaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de jambú (*Acmella oleracea*). As maiores atividades de eliminação do radical DPPH do extrato metanólico e padrão (ácido ascórbico) foram 58,70% e 70,58%, respectivamente. A IC₅₀ do extrato foi considerado 5,19 µg/mL enquanto o do padrão foi 4.11 µg/mL. A cerveja adicionada de jambú obteve valor de 3,84±0,70 mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e 0,21±0,05 mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH. Tendo em vista pesquisas anteriores, a atividade antioxidante da cerveja BJB pode ser em partes atribuída a adição desta planta em sua formulação.

Sousa e colaboradores (2011) fizeram a elucidação de compostos antioxidantes em poupas de frutas tropicais, dentre elas o bacuri (*Platonia insignis*). Observaram um teor de 222,80 ± 6,75 de carotenóides (µg/100 g), 3,31.10⁻³±0,80 de antocianinas (µg/100 g), 0,95 ± 0,20 de flavonóides (µg/g), 35,71±0,00 de vitamina C (mg/100 g), 8,57 ± 0,09 de fenólicos totais (mg ácido gálico/ 100 g resíduo de polpa de fruta). A presença destes compostos pode explicar a boa atividade antioxidante deste fruto in natura ou incorporado a alguma formulação alimentícia. A cerveja adicionada de bacuri obteve valor de 4,50±0,42 mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio ABTS e 0,42±0,07 mmol/L equivalentes de Trolox no ensaio DPPH, além do teor de fenólicos totais de 191,81±0,61 mg/L equivalentes de ácido gálico. O maior teor de fenólicos totais observado neste estudo pode ser explicado pela complexidade de compostos, de relevante atividade antioxidante, encontrados na cerveja.

Em contrapartida, três das quatro amostras controle utilizadas, TBT (Lager), TBWI (Ale) e ABPL (Lager) foram as que apresentaram menor atividade antioxidante no ensaio de ABTS, sendo 2,25 ± 0,31; 2,40 ± 0,18; e 3,08 ± 0,36 mmol/ L trolox equivalente, respectivamente. Dentre estas, a amostra controle ABPL foi a que apresentou menor teor de fenólicos, expressando um resultado de 83,29 ± 0,30 mg/L equivalentes de ácido gálico; culminando em baixo teor de flavonoides totais 43,82 ± 0,42 mg/L equivalentes de quercetina. Com exceção da amostra controle ABL, as demais apresentaram menor atividade antioxidante quando comparadas as amostras que possuem adição de ingredientes amazônicos em sua composição, constatando o aumento de bioativos da bebida após adição destes ingredientes.

Segundo Neto e colaboradores (2017), ao estudarem a atividade antioxidante de vinte e sete cervejas comerciais brasileiras, constataram que o grupo de cervejas to tipo Ale apresenta melhor atividade antioxidante e melhores valores de fenólicos totais do que o grupo de cervejas Lager. Contudo, com o presente estudo não foi possível fazer esta afirmação uma vez que das quinze amostras analisadas, nove eram Ale e seis Lager, além de haver boas atividades em ambos os grupo. Em um estudo realizado com trinta e quatro cervejas comercializadas em mercados chineses, pôde-se observar que o teor de fenólicos totais variou de 152,01 a 339,12 mg equivalentes de ácido gálico/ L de cerveja. Já a atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH variou de 0,24 a 1,35 mmol equivalentes de trolox / L de cerveja (ZHAO et. al, 2010). Estes achados reafirmam que a adição de ingredientes amazônicos pode melhorar a atividade antioxidante de cervejas de fabricação tradicional, uma vez que quando puras os teores de atividade antioxidantes são de aproximadamente 2 mmol equivalentes de trolox / L de cerveja.

O uso de ingredientes amazônicos pode contribuir positivamente para melhoria da capacidade antioxidante de cervejas, influenciando na estabilidade do produto. Além do mais, a adição destes ingredientes tem potencial de oferecer caráter funcional a esta bebida. Contudo, são necessários estudos que quantifiquem e caracterizem os compostos fenólicos e outros que possam contribuir para a atividade antioxidante encontrada, tendo o cuidado de lembrar que açúcares redutores e aditivos podem afetar tais resultados.

5.3 Análise do perfil químico

O processo de purificação das amostras teve por intuito remover quaisquer interferentes que pudessem impedir a detecção do perfil químico por ESI-MS, dificultando o agrupamento das amostras segundo seus respectivos componentes principais. Após análise em ESI-MS, foi realizada a avaliação quimiométrica dos dados, sendo notória a distinção de três grupos. A figura 10A ilustra os grupos formados, sendo o grupo 1, composto pela amostra BJB (jambu); grupo 2 representado pelas amostras ABP (priprioca), ABA (açai) e ABC (camu-camu); e o 3 pelas demais amostras (controles, bacuri, puxuri, taperebá, erva-chama, araçá-boi e cupulate). Em contrapartida, na figura 10 B é possível observar quais íons propiciaram tais agrupamentos. Íons m/z 345 e 359 deram origem ao grupo 1; os íons m/z 238, 377 e 210 deram origem ao grupo 2; e os íons m/z 361 e 347 deram

origem ao grupo 3. Através dos espectros de fragmentação desses íons, foi realizada a comparação com fragmentações previamente descritas. Em seguida, uma análise dos espectros de MS/MS destes marcadores foi realizada, sendo possível observar fragmentos chave descritos anteriormente para iso- α -ácidos (VANHOENACKER; KEUKELEIRE; SANDRA, 2014).

O espectro de MS/MS do íon de m/z 347 (Grupo III) apresentou como principais fragmentos os íons de m/z 181, 233 e 329, sendo estes consistentes com a estrutura do iso- α -ácido *cis*-isocohumulona. Já o íon de m/z 361 (Grupo III) evidenciou a importância dos íons de m/z 195, 247 e 343, estando este padrão de fragmentação de acordo com a estrutura do iso- α -ácido *cis*-isohumulona. Embora os íons responsáveis pela segregação dos grupos I (m/z 345 e 359) e II (m/z 363 e 377) não tenham sido atribuídos, estes apresentaram evidências de iso- α -ácidos. Os espectros de MS/MS dos íons de m/z 345 e 363 apresentaram um pico base de m/z 181, semelhante ao observado para a estrutura do iso- α -ácido *cis*-isocohumulona, sugerindo se tratar de estruturas análogas. Por outro lado, os espectros de MS/MS dos íons de m/z 359 e 377 evidenciaram um pico base de m/z 195, sugerindo se tratar de estruturas análogas ao iso- α -ácido *cis*-isohumulona.

Os α -ácidos representam uma das classes de compostos mais importantes encontrados nas glândulas de resina do lúpulo, os quais são amplamente conhecidos por conferir sabor amargo a cerveja, assim como preservar a estabilidade da espuma e fazer o controle microbiano da bebida. Contudo, para exercer tais funções precisa sofrer processo de isomerização, uma vez não possui boa solubilidade em água (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012). São conhecidos cinco análogos de α -ácidos, dentre eles cohumulona, humulona, adhumulona, pré-humulona e pós-diumulona, sendo os três primeiros os principais representantes da classe. Cerca de 15% da resina ácida do lúpulo é formada por adhumulona, 20 a 50% por cohumulona e 20 a 50% por humulona, dependendo do tipo de lúpulo utilizado (JASKULA et al, 2007). Durante a fabricação da cerveja, ocorre a elevação da temperatura do mosto, a qual é responsável pela isomerização térmica dos α -ácidos em iso- α -ácidos (isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona). Estes compostos são de natureza moderadamente ácida, solubilizando-se melhor em cervejas do tipo lager devido seu pH de 4,2 a 4,4, podendo conferir sabores amargos intensos (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012).

Em estudo realizado por FLORES-CALDERÓN et al. (2017), foi possível quantificar através da técnica de HPLC os teores de iso- α -ácidos em 8 estilos de cervejas e em seus respectivos mostos. Evidenciou-se maiores teores destes compostos no mosto (21.4–33.5 mg/L) que na cerveja madura (15.2–21.3 mg/L), sendo a cerveja do estilo 8, de composição Caramel malt (15%), chili (10 g/L), hops (2 g/L), a que apresentou maiores teores desta classe em comparação com as demais. BAIANO e TERRACONE (2013) ao analisarem nove amostras de cervejas do mercado local da cidade Foggia (Itália), fizeram um estudo a fim de correlacionar a atividade antioxidante da cerveja com a presença de iso- α -ácido e fenólicos totais. Os iso- α -ácidos *trans*-di-hidro-isocohumulona e cohumulona foram os compostos mais abundantes nas amostras do presente estudo. Entretanto, foi possível observar que o teor de iso- α -ácido não é correlacionável com a capacidade antioxidante das cervejas adicionadas de ingredientes amazônicos, apenas com o teor de fenólicos totais. Dessa forma, acredita-se que a elucidação da composição de flavonoides e ácidos fenólicos utilizando técnicas como HPLC-ESI-MS seria mais adequada para encontrar correlações entre esses compostos e a capacidade antioxidantes das cervejas e que trabalhos futuros podem ser focados nessa abordagem.

6. CONCLUSÃO

Foi possível observar que as cervejas analisadas eram de caráter ácido (4,21-5,64), contudo as demais características físico-químicas variaram bastante entre si, fato atribuído a inserção de diferentes ingredientes em sua fabricação. A amostra ABB (bacuri) foi a que apresentou o maior teor de açúcares totais, sendo os monossacarídeos (glicose) a classe mais abundante representada pela glicose. No entanto, a amostra ABPL (controle) foi a que apresentou menor teor de açúcares, sendo os malto-oligosacarídeos (maltotetraose) a classe mais abundante.

Na avaliação da atividade antioxidante a amostra ABC (camu-camu) foi a que apresentou maior atividade antioxidante tanto no ensaio de DPPH quanto ABTS, apresentando inibição de $5,15 \pm 1,60$ mmol/L eq. de trolox e $12,66 \pm 0,13$ mmol/L eq. de trolox, respectivamente. Esta atividade pode ser atribuída aos seus altos teores de fenóis totais ($308,80 \pm 2,84$) e flavonoides ($222,29 \pm 1,02$). A amostra ABPL, do grupo controle, foi a que apresentou menor teor de fenólicos, expressando um resultado de $83,29 \pm 0,30$ mg/L equivalentes de ácido gálico; culminando uma baixa atividade antioxidante. A adição de ingredientes amazônicos, no geral, melhorou as propriedades antioxidantes das amostras quando comparadas as amostras controle (sem adição de ingredientes).

Com a análise química por ESI-MS, seguido da análise quimiométrica, foi possível observar a formação de 3 grupos, sendo orientada pelos íons m/z 345 e 359 (grupo I); os íons m/z 238, 377 e 210 (grupo II); e os íons m/z 361 e 347 (grupo III). Devido ao padrão de fragmentação destes íons principais, foi possível observar a presença dos iso- α -ácidos *cis*-isocohumulona e *cis*-isohumulona. Tendo em vista a importância econômica e cultural da cerveja e dos ingredientes de origem amazônica, novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar outras propriedades biológicas de cervejas acrescida destes ingredientes.

8. REFERÊNCIAS

AGU; PALMER. **Enzymic Breakdown of Endosperm Proteins of Sorghum At Different**. Journal of the Institute of Brewing, v. 13, n. December, p. 415–418, 1996.

ALDUGHPASSI, A.; WOLEVER, T. M. S.; ABDEL-AAL, E. S. M. **Barley**. Encyclopedia of Food and Health, p. 328–331, 2015.

ALMEIDA, F. S., ANDRADE SILVA, C. A., LIMA, S. M., SUAREZ, Y. R., CUNHA A., L. H. **Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process**. Food Chemistry, 263, 112–118, 2018.

ALVES, FLÁVIA. **"Sorgo: o grão que previne doenças, combate o envelhecimento e ajuda a emagrecer**. Gazeta do povo. 24/05/2018. Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/viver-bem/saude-e-bem-star/saude/conheca-o-sorgo-grao-que-combate-cancer-e-ajuda-a-emagrecer/>> Acessado em: 03/08/2019.

ALVIM, R. P. R. et al. **Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil**. Journal of the Institute of Brewing, v. 123, n. 2, p. 219–225, 2017.

AMBEV, 2019. **Uma história de sucesso que ainda está sendo escrita**. Disponível em: <<https://www.ambev.com.br/sobre/nossa-historia/#1434-1996>>. Acessado em: 05/08/2019

AOAC. **Official Methods of Analysis** of AOAC International 20th. Washington DC. 2016.

AQUILANI, B. et al. **Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences**. Food Quality and Preference, v. 41, p. 214–224, 2015.

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

ARPA. Ministério do Meio Ambiente. **Programa áreas protegidas da amazônia arpa** – fase ii (documento de programa do governo brasileiro). Brasília, DF, 2010.

AZEVEDO, S. G. et al. **Bioactivity of Licaria puchury-major essential oil against Aedes aegypti, Tetranychus urticae and Cerataphis lataniae**. Records of Natural Products, v. 12, n. 3, p. 229–238, 2018.

BARTH-HAAS GROUP. **Hops 2017/2018**. p. 32, 2018.

BAIANO, A., & TERRACONE, C. **Physico-Chemical Indices, Iso-alpha-Acid, Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Commercial Beers**. Journal of Food Research, 2(4), 107, 2013.

BETTENHAUSEN, H. M. et al. **Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability**. Food Research International, v. 113, n. July, p. 487–504, 2018.

BORTOLI, D. et al. **Leveduras e produção de cervejas - Revisão**. Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 3, n. 1, p. 45–58, 2013.

BRASIL. Decreto N°6.871. **Regulamenta a Lei n° 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**, 2009.

CABALLERO, I., BLANCO, C. A., PORRAS, M. **Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage**. Trends in Food Science & Technology, 2012.

CABRAL, B. et al. **Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of Spondias mombin leaves**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CASTRO, J. C.; MADDOX, J. D.; IMÁN, S. A. **Camu-camu— Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh**. Exotic Fruits, p. 97–105, 2018.

CECCARONI, D. et al. **Specialty rice malt optimization and improvement of rice malt beer aspect and aroma**. Food Science and Technology, v. 99, n. September 2018, p. 299–305, 2019.

CHEIRAN, K. P. et al. **Simultaneous identification of low-molecular weight**

phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. Food Chemistry, v. 286, p. 113–122, 2019.

CHIVA-BLANCH, G. et al. **The non-alcoholic fraction of beer increases stromal cell derived factor 1 and the number of circulating endothelial progenitor cells in high cardiovascular risk subjects: A randomized clinical trial.** Atherosclerosis, v. 233, n. 2, p. 518–524, 2014.

COELHO, E., MAGALHÃES, J., PEREIRA, F. B., MACIEIRA, F., DOMINGUES, L., & OLIVEIRA, J. M. **Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers.** Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 2019.

CSALA, M. et al. **On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease.** Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, v. 1852, n. 5, p. 826–838, 2015.

CUNHA-SANTOS, E. C. E. et al. **Vitamin C in camu-camu [Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods.** Food Research International, v. 115, n. April, p. 160–166, 2019.

DING, J. et al. **Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction of xanthohumol in beer coupled with high-performance liquid chromatography determination.** Journal of Separation Science, v. 34, n. 12, p. 1463–1468, 2011.

DRAGONE, G. ALMEIDA e SILVA, J.B. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia.** V.1. São Paulo: Edgard Blücher, 2010.

EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica – EBC.** 5th ed. Zurique: Brauerei – und Getränke – Rundschau, 2005.

ELROD, S. M. **Xanthohumol and the Medicinal Benefits of Beer.** 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

FALTERMAIER, A. et al. **Common wheat (Triticum aestivum L.) and its use as a brewing cereal - a review.** Journal of the Institute of Brewing, v. 120, n. 1, p. 1–15, 2014.

FERREIRA, R. H. et al. **Inovação na fabricação de cervejas especiais na região**

de Belo Horizonte. *Perspectivas em Ciência da Informação*, v. 16, n. 4, p. 171–191, 2011.

FLORES-CALDERÓN, A. M. D., LUNA, H., ESCALONA-BUENDÍA, H.B., VERDE-CALVO, J.R. **Chemical characterization and antioxidant capacity in blue corn (*Zea mays* L.) malt beers**. Institute of Brewing & Distilling. 2017

FEGUEDO, J. A., MEYNELL, R., LAI, A. K. H., WONG, M. C. Y., MARTIN, C. R., WISEMAN, H., & PREEDY, V. R. **The Antioxidant Capacity of Beer: Relationships Between Assays of Antioxidant Capacity, Color and Other Alcoholic and Non-alcoholic Beverages**. *Beer in Health and Disease Prevention*, 475–481, 2009.

GARZÓN, G. A. et al. **Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia**. *Food Chemistry*, v. 217, p. 364–372, 2017.

GIANNETTI, V. et al. **Flavour component analysis by HS-SPME/GC–MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers**. *Microchemical Journal*, Volume 149, September 2019.

GOMES et al. **Variabilidade genética em linhagens de milho nas características relacionadas com a produtividade de silagem**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 9, p. 879–885, 2004.

GÓMEZ-CORONA, C. et al. **Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico**. *Appetite*, v. 96, p. 358–367, 2016.

GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RODRÍGUEZ, P. M.; VALLS-BELLÉS, V. **Beer and Its Role in Human Health**. Elsevier Inc., 2017.

GOODE, D. L.; WIJNGAARD, H. H.; ARENDT, E. K. **Mashing with Unmalted Barley — Impact of Malted Barley and Commercial Enzyme (*Bacillus* spp.) Additions**. *MBAA Technical Quarterly*, v. 42, n. 3, p. 184–198, 2005.

GRANATO, D. et al. **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, v. 91, n. 3, p. 563–571, 2011.

GUO, X.; JIN, Y.; DU, J. **Extraction and purification of an endo-1,4- β -xylanase from wheat malt.** Journal of Cereal Science, v. 74, p. 218–223, 2017.

GUPTA, S. C. et al. **Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 559, n. June, p. 91–99, 2014.

GUYOT-DECLERCK, C., FRANÇOIS, N., RITTER, C., GOVAERTS, B., & COLLIN, S. **Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data.** Food Quality and Preference, 16(2), 157–162, 2005.

HARRISON, M. A. **Beer/Brewing.** Encyclopedia of Microbiology, n. September, p. 23–33, 2017.

HELSTAD. **Topics in Brewing: Brewing Adjuncts – Liquid.** Technical Quarterly, v. 50, n. 3, p. 99–104, 2013.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, A. et al. **Mediterranean alcohol-drinking pattern and the incidence of cardiovascular disease and cardiovascular mortality: The SUN project.** Nutrients, v. 7, n. 11, p. 9116–9126, 2015.

HERRERA-CALDERON, O. et al. Anticonvulsant effect of ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. leaves on pentylenetetrazol induced seizure in mice. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 95–99, 2018.

HORNSEY, I. **Melanoidins.** The Oxford Companion to Beer. Oxford University Press, New York, p. 582, 2012.

HORNSEY, I. **Beer: History and Types.** Encyclopedia of Food and Health, 2016.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. **Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods.** Journal of Berry Research, v. 1, n. 4, p. 189–199, 2011.

ISLAM, S. M. S. et al. **Non Communicable Diseases (NCDs) in developing countries: A symposium report.** Globalization and Health, v. 10, n. 1, 2014.

JACOB, C.; JAMIER, V.; BA, L. A. **Redox active secondary metabolites.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 15, n. 1, p. 149–155, 2011.

JACOMINO, A. P.; PINTO, P. M.; GALLON, C. Z. **Bacuri— Platonía insignis.** [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

JASKULA, B., GOIRIS, K., ROUCK, G. DE., AERTS, G., COOMAN, L. **Enhanced quantitative extraction and HPLC determination of hop and beer bitter acids.** The Institute of Brewing & Distilling, 113(4), 2007.

JIN, Z. et al. **Production of deoxynivalenol (DON) and DON-3-glucoside during the malting of Fusarium infected hard red spring wheat.** Food Control, v. 85, p. 6–10, 2018.

KING, A. J.; DICKINSON, J. R. **Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts.** FEMS Yeast Research, v. 3, n. 1, p. 53–62, 2003.

LALTHANPUII P.B., LALRUATFELA B., VANLALDINPUIA K., LALREMSANGA H.T., LALCHHANDAMA K. **Antioxidant and cytotoxic properties of *Acmella oleracea*.** Medicinal Plants, 10(4) December 2018

LANGA, S., VAN DEN BULCK, E., PEIROTÉN, A., GAYA, P., SCHOLS, H. A., & ARQUÉS, J. L. **Application of lactobacilli and prebiotic oligosaccharides for the development of a synbiotic semi-hard cheese.** Food Science and Technology, 114, 2019.

LEI, H., XU, H., FENG, L., YU, Z., ZHAO, H., & ZHAO, M. **Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 122(5), 583–588, 2016.

LEITE, C., A., FORTE, O., K., SILVA P., P.; VITORIANO R., D., M.; PEREIRA, S. K.; FERNANDES V., F. **Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (OBrix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas.** Industrializados Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 6, núm. 1, janeiro-abril, 2006.

LI, Q.; WANG, J.; LIU, C. **Beers**, 2016.

LÍLIAN, M. B. et al. **Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 00, n. 00, p. 1–6, 2019.

LIMA, H. M. R., GALVAO, F. F. S. P. **Consumo infantil de bebidas lácteas: sólidos solúveis totais (Brix) e pH**. Odontologia Clínico-científica., vol.10, n.3, pp. 237-241, 2011.

LIU, M. et al. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 754–779, 2015.

MACHADO, J. C. et al. **Modeling of α -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers**. Food Chemistry, v. 278, p. 216–222, 2019.

MAGALHÃES; DURÃES. Fisiologia da Produção de Milho. v. d, 2006.

MAKWANA, M.; HATI, S. **Fermented Beverages and Their Health Benefits**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

MANNERS, D. J.; MARSHALL, J. J.; YELLOWLEES, D. **The Specificity of Cereal Limit Dextrinases** By. p. 539–541, 1970.

MARTINS, C. et al. **Unveiling the lager beer volatile terpenic compounds**. Food Research International, v. 114, p. 199–207, 2018.

MAYER, H. et al. **Development of an all rice malt beer: A gluten free alternative**. Food Science and Technology, v. 67, p. 67–73, 2016.

MEGA; NEVES; ANDRADE. A produção da cerveja no brasil. **A produção da cerveja no brasil**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2011.

MESÍAS, M.; DELGADO-ANDRADE, C. **Melanoidins as a potential functional food ingredient**. Current Opinion in Food Science, v. 14, p. 37–42, 2017.

MILLANI, E., KONSTANTYNER, T. , TADDEI, J.A. A. C. **Efeitos da utilização de prebióticos (oligossacarídeos) na saúde da criança.** Revista Paulista Pediatrica;27(4):436-46, 2009.

MONERAWELA, C.; BOND, U. **Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved.** Biotechnology Advances, v. 35, n. 4, p. 512–519, 2017.

MONTANARI, L. et al. Organic and Phenolic Acids in Beer. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 535–539, 1999.

MORADO, R. **Larousse da cerveja.** São Paulo. Larousse do Brasil, 2009.

NERI-NUMA, I. A. et al. **Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (Eugenia stipitata Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest.** Food Research International, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NERI-NUMA, I. A. et al. **Iridoid blue-based pigments of Genipa americana L. (Rubiaceae) extract: Influence of pH and temperature on color stability and antioxidant capacity during in vitro simulated digestion.** Food Chemistry, v. 263, p. 300–306, 2018.

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

NEVES, D. A. et al. **Chemical and nutritional characterization of raw and hydrothermal processed jambu (Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen).** Food Research International, v. 116, n. August, p. 1144–1152, 2019.

OLANIRAN, A. O.; MAHARAJ, Y. R.; PILLAY, B. **Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 14, n. 2, 2011.

OLIVEIRA NETO, J. R. et al. **Antioxidant and vasodilatory activity of commercial beers.** Journal of Functional Foods, v. 34, p. 130–138, 2017.

PAVSLER, A.; BUIATTI, S. **Lager Beer**. Beer in Health and Disease Prevention, p. 31–43, 2010.

PEIXOTO, H. et al. **An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans***. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 64, n. 6, p. 1283–1290, 2016.

PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K. G.; RODRIGUES, S. **Cupuassu— *Theobroma grandiflorum***. Exotic Fruits, v. 2010, p. 159–162, 2018.

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI, M. **Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 19, p. 10677–10683, 2010.

PISTELLI, L. et al. **Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars**. Industrial Crops and Products, v. 124, n. August, p. 653–662, 2018.

POLAK, J.; BARTOSZEK, M.; STANIMIROVA, I. **A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance**. Food Chemistry, v. 141, n. 3, p. 3042–3049, 2013.

PRAET, T. et al. **Changes in the hop-derived volatile profile upon lab scale boiling**. Food Research International, v. 75, p. 1–10, 2015.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L. **Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

REGIONAL NEWS. **Lúpulo, o aroma da saúde**. Regionalnews.com. 2018. Disponível em: <<https://rnews.com.br/lupulo-o-aroma-da-saude.html>> Acessado em:

03/08/201

RIVERO, D. et al. **Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 9, p. 3637–3642, 2005.

RODRÍGUEZ, Y. B.; AGUILAR, I. G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. DE. **Utilização do malte de sorgo na produção de cerveja: revisão bibliográfica.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 21, n. 0, 2018.

ROSA; AFONSO. **A Química da Cerveja Química e Sociedade.** v. 37, p. 98–105, 2015.

SANCHES, E. A.; TROVATI, G.; CHIERICE, G. O. **Chemical analysis of the essential oil extracted from the seeds of licaria puchury-major.** Journal of Essential Oil Research, v. 20, n. 3, p. 191–192, 2008.

SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND. **Breeding of lager yeast with Saccharomyces cerevisiae improves stress resistance and fermentation performance.** n. January, p. 2–5, 2012.

SHANTY, A.; MOHANAN, P. **Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 192, p. 181-187, 2017.

SHAHIDI F. **Natural antioxidants: an overview.** In: Shahidi F. Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. Newfoundland: Aocs; p.1-11; 1996.

SHELLHAMMER, T. H.. **Beer color.** Beer, 213–227, 2009.

SHIMIZU, M., HACHIMURA, S. **Gut as a target for functional food.** Trends in Food Science & Technology, vol. 22 (12): p. 646-650, 2011.

SILVA, F. M. A. et al. **Chemotaxonomy of the Amazonian unonopsis species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 27, n. 3, p. 599–604, 2016.

SINGLETON, V. L., & ROSSI, J. A.. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. American Journal Enology and Viticulture, 16, 144–158, 1965.

SITE **AGRANDA SEMENTES**. Disponível em: <<https://www.agranda.com.br/produto/semente-de-trigo-tbio-toruk-biotrigo/>>. Acessado em: 03/08/2019

SITE **CERVEJA ARTESANAL**. Arte Brew. 2018. Disponível em: <<https://www.cervejaartesanal.com.br/lupulo-saphir-500gr>> Acessado em: 03/08/2019.

SITE SPITALFIELDS LIFE. **S. cerevisiae NCYC 1026**. 19/06/2013. Disponível em: <<http://spitalfieldslife.com/2013/06/20/the-return-of-trumans-yeast/s-cerevisiae-ncyc-1026/>>. Acessado em: 03/08/2019

SITE UAI. **Grão da cevada é aliado na dieta e no combate à obesidade**. Plena saúde. 21/07/2015. Disponível em: <<https://www.uai.com.br/app/noticia/saude/2015/07/21/noticias-saude,187294/grao-da-cevada-e-aliado-na-dieta-e-no-combate-a-obesidade.shtm>>Acessado em: 03/08/2019 .

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. ; JUNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, vol.30, n. 2, São Paulo, Mar./Apr. 2007.

SOUSA M. S. B , VIEIRAL. M., SILVA M. J. M. , LIMA A. **Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais**. Ciência e Agrotecnologia., Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011

STEFANUTO, P. H. et al. **Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1507, p. 45–52, 2017.

STEINER, E. et al. **Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 4, p. 803–813, 2012.

STEWART, G. G. **Adjuncts**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

STEWART, G. G. **Beer: Raw Materials and Wort Production**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G; COSTA, J.N. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos**. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde.14(4):263-9, 2012.

TAFULO, P. A. R. et al. **Control and comparison of the antioxidant capacity of beers**. Food Research International, v. 43, n. 6, p. 1702–1709, 2010.

VANHOENACKER, G., KEUKELEIRE, D., SANDRA, P. **Analysis of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, 1035(1), 53–61, 2004.

VILAHUR, G. et al. **Beer elicits vasculoprotective effects through Akt/eNOS activation**. European Journal of Clinical Investigation, v. 44, n. 12, p. 1177–1188, 2014.

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. **Genome Sequence of Saccharomyces carlsbergensis, the World's First Pure Culture Lager Yeast**. Genes|Genomes|Genetics, v. 4, n. 5, p. 783–793, 2014.

WOLFE K. L.; LIU R. H. **Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods and Dietary Supplements**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Department of Food Science and institute of Comparative and Environmental Toxicology, Cornell University, Ithaca, New York, v. 55 , p. 8896-8907, 2007.

WUNDERLICH; BACK. **General Aspects of Beer and (i) Beer Making , Hops and Yeast Processes , and Quality Criteria**. Beer in Health and Disease Prevention, 2009.

YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. **In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components**

(Humulus lupulus) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*, v. 16, n. 4, p. 369–376, 2009.

ZAPATA, P. J. et al. **Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits.** *Food Science and Technology*, v. 103, p. 139–146, 2019.

ZHAO, H. **Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers.** *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 15–24, 2014.

ZHAO, H. et al. **Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers.** *Food Chemistry*, v. 119, n. 3, p. 1150–1158, 2010.