

KELLEN NATÁLIA PINHEIRO RIBEIRO VITOR

**INFLUÊNCIA DE MALTES ESPECIAIS NO COMPORTAMENTO DE
XANTHUMOL EM CERVEJAS CLARAS E ESCURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V845i
2022
Vitor, Kellen Natália Pinheiro Ribeiro, 1991-
Influência de maltes especiais no comportamento de
xanthohumol em cervejas claras e escuras / Kellen Natália
Pinheiro Ribeiro Vitor. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (68 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Referências bibliográficas: f. 60-68.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.757>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cerveja - Sabor e aroma. 2. Malte. 3. Flavonóides.
4. Polifenóis. I. Pereira, Alexandre Fontes, 1979-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDD 22. ed. 663.42

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

KELLEN NATÁLIA PINHEIRO RIBEIRO VITOR

**INFLUÊNCIA DE MALTES ESPECIAIS NO COMPORTAMENTO DE
XANTHUMOL EM CERVEJAS CLARAS E ESCURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2022

Assentimento:



Kellen Natália Pinheiro Ribeiro Vitor

Autora



Alexandre Fontes Pereira

Orientador

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir realizar mais esse sonho. Aos meus pais, Marcelo e Carminha, e ao meu esposo, Mauro, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em minhas decisões

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as conquistas e por tudo o que sou hoje, por sempre guiar e iluminar meu caminho, me proporcionando as melhores coisas dentro do tempo certo e conforme a Sua vontade.

Agradeço aos meus pais, Marcelo e Carminha, que sempre foram grandes incentivadores da minha educação, sempre fizeram tudo o que podiam para me ofertar o melhor e sempre acreditaram em mim. Sou muito grata a vocês e espero um dia poder retribuir por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida. À minha amiga, Svetlana, que tanto me ajudou seja me acompanhando nos momentos de escrita e me tranquilizando nos momentos de angústia.

Agradeço ao meu marido, Mauro, por todo apoio, paciência e suporte ao longo desses anos, por sempre acreditar no meu potencial e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Alexandre Fontes, agradeço por todos os ensinamentos, pelo acolhimento, suporte e paciência ao longo desse projeto.

A todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, em especial à Luciana, e a todos que contribuíram direta e indiretamente com esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“É justo que muito custe, o que muito vale”.
(Santa Teresa D’Avila)

RESUMO

VITOR, Kellen Natália Pinheiro Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Influência de maltes especiais no comportamento de xanthohumol em cervejas claras e escuras.** Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Maltes especiais são comumente usados na fabricação de cerveja para fornecer sabor, aroma e cor à cerveja. O uso destes contribui para a variedade de produtos cervejeiros; portanto, é importante entender seu efeito nas características do produto. O malte de cevada é responsável por cerca de 80% do total de fenólicos da cerveja, enquanto os 20% restantes são oriundos do lúpulo. Tais compostos são os principais responsáveis pela bioatividade das cervejas. Dentro da classe de polifenóis, o xanthohumol – proveniente do lúpulo - é um composto com propriedades anticarcinogênica comprovada, além de atividade antimicrobiana e antioxidante. Sabe-se que, sua solubilidade é maior em mostos preparados a partir de maltes torrados. A busca do consumidor por estilos de vida mais saudáveis resultou no aumento da demanda por cervejas funcionais, despertando atenção para compostos bioativos, principalmente xanthohumol. Este estudo tem por objetivo avaliar a diferença de concentração de polifenóis e xanthohumol em cerveja obtida a partir de três variedades de maltes especiais. Uma cerveja controle foi preparada com 100% de malte base e três tratamentos foram elaborados com a adição de malte CaraAroma, Caramelo 200 e CaraGold. Para cada tratamento, durante a preparação do mosto, 10% do malte base foi substituído pelas 3 variedades de malte definidas. Por meio da análise estatística, observou-se que para cerveja preparada com a adição de maltes torrados, o conteúdo de fenólicos totais variou entre 238,2 e 375,12 mg GAE.L⁻¹, o que corresponde a um aumento de até 77,5% na concentração de compostos fenólicos quando comparado à amostra controle. O teor de xanthohumol variou entre 2,667 mg.L⁻¹ (controle) e 5,755 mg.L⁻¹ (tratamento utilizando malte CaraAroma). Estes valores representam um aumento de até 115,8% na concentração de xanthohumol com a utilização maltes torrados. Correlações positivas ($R^2=0,87$ e $0,885$) foram observadas para a relação entre a cor e o teor de xanthohumol e para a relação entre o teor de xanthohumol e o conteúdo de fenólicos totais, respectivamente. A cor da cerveja, conteúdo de fenólicos totais e teor de xanthohumol têm relação direta com a presença de melanoidinas que contribuem para o aumento da concentração de polifenóis e xanthohumol, por se ligarem a estes compostos, aumentando a sua solubilização e reduzindo suas perdas.

Palavras-chave: Prenilflavonóides. Flavonóides. Bioatividade. Polifenóis. Melanoidinas.

ABSTRACT

VITOR, Kellen Natália Pinheiro Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Influence of special malts on the behavior of xanthohumol in light and dark beers.** Adviser: Alexandre Fontes Pereira.

Specialty malts are commonly used in brewing to provide flavor, aroma and color to beer. The use of these contributes to the variety of brewing products; therefore, it is important to understand its effect on product characteristics. Barley malt accounts for about 80% of the total phenolics in beer, while the remaining 20% comes from hops. Such compounds are the main responsible for the bioactivity of beers. Within the class of polyphenols, xanthohumol - from hops - is a compound with proven anticarcinogenic properties, as well as antimicrobial and antioxidant activity. It is known that its solubility is higher in musts prepared from roasted malts. The consumer's search for healthier lifestyles resulted in an increase in the demand for functional beers, drawing attention to bioactive compounds, mainly xanthohumol. This study aims to evaluate the difference in concentration of polyphenols and xanthohumol in beer obtained from three varieties of special malts. A control beer was prepared with 100% base malt and three treatments were elaborated with the addition of CaraAroma, Caramelo 200 and CaraGold malt. For each treatment, during wort preparation, 10% of the base malt was replaced by the 3 defined malt varieties. Through statistical analysis, it was observed that for beer prepared with the addition of roasted malts, the total phenolic content varied between 238,2 and 375,12 mg GAE.L⁻¹, which corresponds to an increase of up to 77,5% in the concentration of phenolic compounds when compared to the control sample. The xanthohumol content varied between 2,667 mg.L⁻¹ (control) and 5,755 mg.L⁻¹ (treatment using CaraAroma malt). These values represent an increase of up to 115,8% in the concentration of xanthohumol with the use of roasted malts. Positive correlations ($R^2=0,87$ and $0,885$) were observed for the relationship between color and xanthohumol content and for the relationship between xanthohumol content and total phenolic content, respectively. The beer color, total phenolic content and xanthohumol content are directly related to the presence of melanoidins that contribute to the increase in the concentration of polyphenols and xanthohumol, by binding to these compounds, increasing their solubilization and reducing their losses.

Keywords: Prenylflavonoids. Flavonoids. Bioactivity. Polyphenols. Melanoidins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais prenilflavonóides presente no lúpulo.....	18
Figura 2 – Diferentes variedades de malte de cevada.....	20
Figura 3 - Características sensoriais de diferentes tipos de malte.....	23
Figura 4 - Diagrama de Hodge.....	25
Figura 5 - Estrutura química básica dos flavonoides.....	29
Figura 6 - Estrutura química do Xanthohumol.....	30
Figura 7 - Glândulas de lupulina das inflorescências femininas da planta de lúpulo.....	30
Figura 8 - Fluxograma da produção de cerveja e perdas de xanthohumol.....	34
Figura 9 - Fluxograma do processo.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Caracterização de diferentes variedades de malte de acordo com a cor.....	21
Gráfico 2 - Rampa de brassagem utilizada na produção de cerveja.....	38
Gráfico 3 - Curva de consumo de substrato para as cervejas em função do tempo de fermentação.....	43
Gráfico 4 - Variação de pH para as cervejas produzidas em função do tempo de fermentação.....	43
Gráfico 5 - Representação gráfica da cor das cervejas analisadas.....	45
Gráfico 6 - Correlação entre a cor do malte e a cor da cerveja.....	46
Gráfico 7 - Curva de calibração para determinação do CPT.....	47
Gráfico 8 - Representação gráfica do CPT.....	47
Gráfico 9 - Correlação entre a cor do malte e o índice de polifenóis totais na cerveja.....	50
Gráfico 10 - Curva de calibração para determinação do teor de xanthohumol.....	51
Gráfico 11 - Representação gráfica do teor de xanthohumol.....	52
Gráfico 12 - Correlação entre a cor do malte e o teor de XN.....	55
Gráfico 13 - Gráficos de dispersão para variáveis selecionadas. (a) Relação entre Cor e XN (teor de xanthohumol). (b) Relação entre Cor da cerveja e TPC (conteúdo de polifenóis). (c) Relação entre TPC e XN.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química média das inflorescências de lúpulo seco.....	27
Tabela 2 - Benefícios de Xanthohumol para a saúde.....	32
Tabela 3 - Caracterização física das cervejas.....	44
Tabela 4 - Análise do conteúdo de fenólicos totais.....	48
Tabela 5 - Áreas dos picos identificados no LC-MS/MS.....	52
Tabela 6 - Conteúdo de xanthohumol.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
CPT	Conteúdo de Fenólicos Totais
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EBC	European Brewery Convention
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IXN	Isoxanthohumol
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida em Interface com Espectrometria de Massa
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
QqQ	Espectrômetro de Massas Tipo Triplo Quadrupolo
RM	Reação de Maillard
RP-UPLC	Cromatografia Líquida e Separação em Fase Reversa
XN	Xanthohumol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CERVEJA	17
3.1.1 Processo de Produção de Cervejas.....	19
3.2 MALTE	20
3.2.1 Maltes Especiais	22
3.2.2 Reação de Maillard.....	23
3.3 LÚPULO	26
3.3.1 Composição química do lúpulo	26
3.3.2.1 Resinas	27
3.4 POLIFENÓIS.....	28
3.5 XANTHOTHUMOL	29
3.5.1 Perdas de xanthohumol durante o processo de produção da cerveja	33
3.5.2 Variáveis significativas no processo de extração de xanthohumol.....	35
4.1 MATERIAL	37
4.2 PRODUÇÃO DE CERVEJA	37
Fonte: Elaborado pela autora.....	39
4.3 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS.....	39
4.3.1 pH.....	39
4.3.2 Graduação alcoólica	40
4.3.3 Densidade.....	40
4.3.4 Sólidos Solúveis	40
4.3.5 Cor.....	40
4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	41
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE XANTHOTHUMOL.....	41
4.5.1 Preparo das amostras	41
4.5.2 Cromatografia líquida em interface com espectrometria de massa	42
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	43
Fonte: Elaborado pela autora.....	43
Fonte: Elaborado pela autora.....	43

5.2 CONTEÚDO DE FENOLICOS TOTAIS	46
5.3 TEOR DE XANTHUMOL	51
5.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E REGRESSÃO LINEAR.....	55
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais apreciadas em países com diferentes climas e culturas no mundo (MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, ficando atrás da China e Estados Unidos (BARTH *et al.*, 2018). Segundo a Legislação Brasileira a cerveja deve ser produzida a partir de água, malte, lúpulo e levedura (BRASIL, 2009).

O mercado cervejeiro do Brasil, vem sofrendo alterações no padrão de consumo de seus produtos. Os consumidores estão cada vez mais interessados em produtos de maior valor agregado e maior qualidade. Nota-se que estão entrando no mercado mais cervejarias de menor porte e cervejarias artesanais que conseguem atender aos novos padrões de qualidade do consumidor. Alguns produtos inovadores se destacam, como as cervejas funcionais, pois buscam combinar o consumo moderado da bebida com benefícios à saúde, atraindo consumidores com base em sua percepção de prevenção de doenças por meio de uma dieta funcional (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2012).

Os polifenóis são conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, têm um papel importante na formação do sabor e do aroma da cerveja. Os polifenóis da cerveja contribuem, também, para outras características importantes do produto final, como adstringência, corpo e plenitude (COLLIN *et al.*, 2013). Estima-se que 80% do total de polifenóis sejam provenientes do malte e 20% do lúpulo.

Dentre os polifenóis presentes no lúpulo, se encontra o xanthohumol (XN). Esse prenilflavonóide está presente na resina dos cones de lúpulo e tem sido amplamente estudado devido as suas características quimiopreventivas e anticarcinogênicas, além de propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e anti-HIV (GERHAUSER *et al.*, 2002; COLGATE *et al.*, 2007; NOWAKOWSKA, 2007; WANG *et al.*, 2004).

Pouco se sabe a respeito de como prever e otimizar a extração de compostos fenólicos, especialmente, xanthohumol, durante a produção da cerveja. No entanto, sabe-se que fatores como variedade e quantidade de malte e lúpulo, tempo e temperatura de extração, método de dispersão do lúpulo, tipo de cerveja e fermento, influenciam na extração desses compostos bioativos para a cerveja (COCUZZA; MITTER, 2013).

Ainda não está claro quais fatores possuem maior influência no processo de extração de xanthohumol durante a produção de cerveja. No entanto, sabe-se que a variedade de malte utilizada no processo produtivo tem papel de destaque na solubilização de xanthohumol no mosto cervejeiro, influenciando positivamente o teor deste polifenol na cerveja final. Inserido

nesse contexto, torna-se importante o estudo da influência das diversas variedades de malte na extração do xanthohumol. Dessa forma, pode ser possível estimar a concentração, agregando valor ao produto, além de fornecer subsídios para novos estudos sobre a inserção de cervejas enriquecidas com xanthohumol no mercado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da variedade do malte na concentração de xanthohumol durante o processo de produção de cerveja, por meio do estudo de maltes com diferentes níveis de torrefação.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as características físico-químicas da cerveja, tais como pH, densidade, cor;
- Determinar a concentração de fenólicos totais e de xanthohumol nas cervejas produzidas;
- Avaliar a diferença na extração de xanthohumol conforme a variedade de malte empregada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CERVEJA

De acordo com a Legislação Brasileira (BRASIL, 2009), art. 36, “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. A escolha da matéria-prima, variedade de levedura, forma de processamento, assim como os compostos produzidos nas etapas de fermentação e maturação convergem para o desenvolvimento de uma cerveja sensorialmente agradável e com as características desejadas (MACHADO JR *et al.*, 2019).

Dentre as matérias-primas utilizadas para produção de cerveja, a água é o insumo mais abundante do processo, uma vez que, aproximadamente, 92% a 95% do peso da cerveja é constituído por água. Portanto, a água deve ser de boa qualidade possuindo, como requisitos básicos, alcalinidade inferior à 50 mg. L⁻¹, concentração de cálcio próximo à 50 mg. L⁻¹ e seguir os padrões de potabilidade. O malte de cevada é a matéria-prima resultante da germinação do grão de cevada sob condições controladas. No malte de cevada o amido apresenta-se em cadeias menores que na cevada, sendo menos duro e mais solúvel. O malte Pilsen é o malte utilizado como base para a produção de cerveja, sendo claro e de sabor ameno. Os diversos tipos de cerveja são elaboradas a partir de combinações do malte base com outras variedades de malte que irão agregar características sensoriais específicas à cerveja. O malte Caramunich III, por exemplo, promove um incremento no corpo da cerveja e intensifica o aroma de malte, por ser um produto com alta torrefação, produz cervejas mais escuras e avermelhadas, além de somar ao produto um sabor intenso de caramelo (VENTURINI FILHO, 2010).

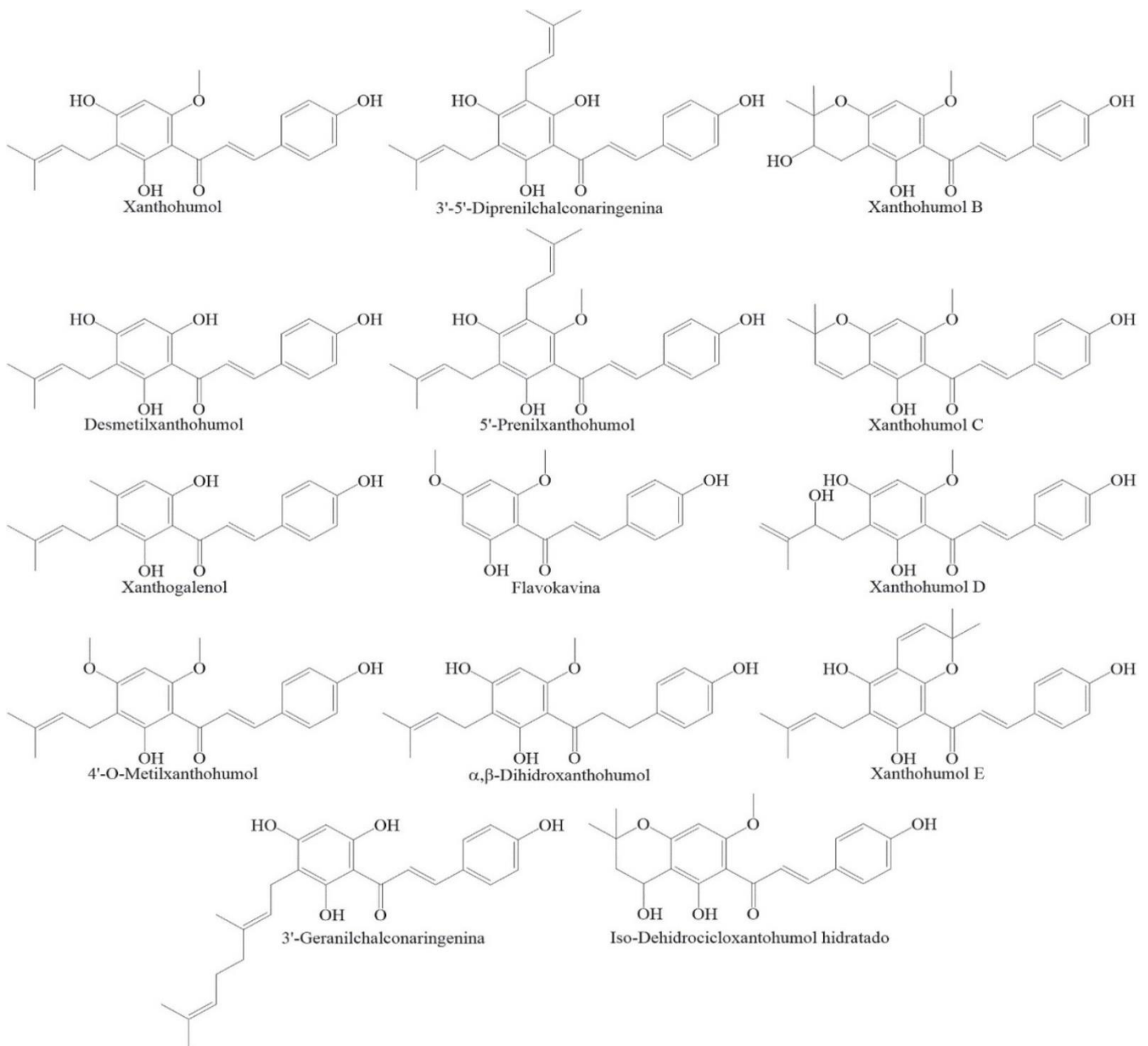
Embora o etanol seja o produto de excreção produzido pela levedura durante a fermentação do mosto, as características de sabor e aroma da cerveja são determinadas de forma preponderante pelo tipo de levedura utilizada devido a vários outros produtos de excreção formados durante a fermentação. As cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* são ideais para produção de cerveja, sendo consideradas seguras e capazes de produzir os dois metabólitos primários essenciais ao processo, etanol e dióxido de carbono (MARTINS *et al.*, 2018).

No início de sua produção, há cerca de 8 mil anos, a cerveja era produzida apenas com água, grãos de cereais e leveduras. O lúpulo só foi introduzido como matéria-prima na fabricação de cervejas no século XV. A extração de compostos como α -ácidos e óleos

essenciais durante o processo de produção fez com que o lúpulo se destacasse de todas as outras ervas já utilizadas ao longo da história para dar sabor e preservar a cerveja, tornando-se essencial ao processo (BETANCUR et al., 2020).

O lúpulo, utilizado para agregar sabor e aroma marcantes à cerveja, possui em sua composição química compostos como xantohumulol e outras chalconas preniladas (Figura 1) que tem recebido muita atenção nos últimos anos com grande potencial benéfico para a saúde (STEVENS; PAGE, 2004).

Figura 1 - Principais prenilflavonóides presente no lúpulo



Fonte: STEVENS, 1967.

3.1.1 Processo de Produção de Cervejas

Independente da escala e do tipo de cerveja, o processo produtivo pode ser descrito pelas seguintes etapas: maltagem, moagem do malte, mosturação, fervura ou cozimento, fermentação, maturação, envase e pasteurização (VIVIAN *et al.*, 2016). Normalmente, a etapa de maltagem não faz parte do processo produtivo em uma planta cervejeira. A indústria cervejeira adquire os grãos de maltarias especializadas, com as características específicas e desejadas para o produto. Dessa forma, na cervejaria, o início ao processo de produção da cerveja se dá a partir da moagem dos grãos.

Na etapa de moagem, os grãos são fragmentados, a fim de expor toda a porção do endosperma, facilitando assim o ataque enzimático. Esse processo permite aumentar a superfície de contato da água com as enzimas, como a alfa e beta amilase, presentes no malte que favorecem a hidrólise do amido (VIEIRA, 2017).

A mosturação ou brassagem é a mistura do malte moído com água, submetidos à temperatura controlada, a fim de ativar diferentes grupos de enzimas que promoverão a hidrólise dos amidos a açúcares fermentescíveis (glicose, maltose e maltotriose). A ativação de alguns tipos de enzimas é realizada em temperaturas específicas, sendo estas: 40-45 °C para β -glucanases; 50-55 °C para proteases; 60-72 °C para α e β -amilases; 76-78 °C para inativação enzimática. Ao final da mosturação, o bagaço de malte é decantado e servirá como camada filtrante para separação do mosto (BAXTER; HUGHES, 2001; VIEIRA, 2017; VIVIAN *et al.*, 2016).

A etapa de fervura promove a concentração do mosto, esterilização, inativação enzimática e coagulação de proteínas, por um período de aproximadamente uma hora, com a adição de lúpulo, quando ocorre a extração de α e β -ácidos e óleos essenciais. Estes compostos amargos e aromáticos do lúpulo são responsáveis pelo aroma e sabor característicos da bebida (KEUKELEIRE, 2000; VENTURINI FILHO, 2010). Após a fervura, o mosto passa pelo processo de *whirlpool*, em que ocorre a decantação dos resíduos, cujo principal objetivo é separá-lo do *trub* e seguir para a etapa de fermentação (MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014).

O processo de fermentação é iniciado após a adição da levedura ao mosto já resfriado. Durante a fase anaeróbica, as leveduras metabolizam os açúcares do mosto, obtidos durante a mosturação, produzindo álcool e CO₂ (OLAJIRE, 2012).

Após o período de fermentação, inicia-se a maturação. O objetivo desta fase é refinar o sabor da cerveja através da redução dos compostos indesejados, tais como: diacetil,

acetaldeído e ácido sulfídrico (KEUKELEIRE, 2000).

A pasteurização é um processo térmico que tem por objetivo aumentar a vida útil das cervejas. É uma técnica que emprega altas temperaturas (60 – 70°C) e logo em seguida, resfriamento, eliminando assim os microrganismos prejudiciais à qualidade da bebida (ROSA; AFONSO, 2015).

3.2 MALTE

O termo malte é utilizado para nomear um cereal que passou por um processo de germinação em condições adequadas, sendo que o principal cereal utilizado na maltagem para a produção de cerveja é a cevada, gramínea da espécie *Hondeum vulgare L.* (BRUNELLI; MANSANO; VENTURINI FILHO, 2014; VENTURINI FILHO, 2010). O malte (Figura 1) é responsável por atribuir sabor, cor e, por fornecer carbono para a bebida, contribui para a formação da espuma do produto.

Figura 2 – Diferentes variedades de malte de cevada

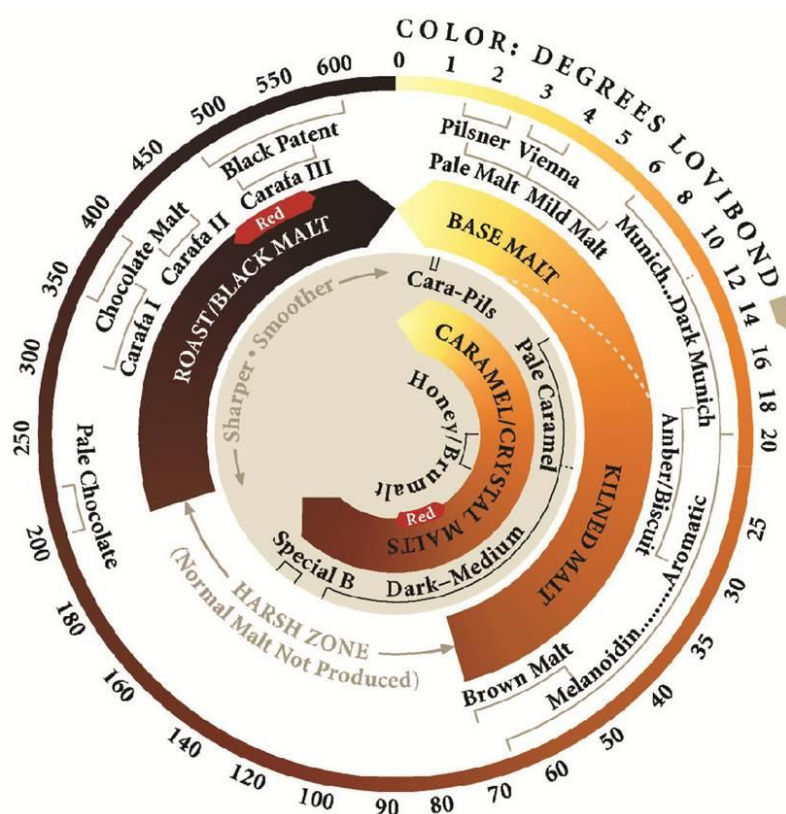


Fonte: HOMINI LUPULO, 2020.

O processo de conversão de cevada em malte consiste no umedecimento e germinação dos grãos, sob condições controladas de tempo e temperatura. Durante essa etapa ocorre a biossíntese de enzimas (amilases, proteases e b-glucanases) necessárias à hidrólise de compostos macromoleculares presente nos grãos (MUDURA; COLDEA, 2015). No decurso do processo, a umidade deve ser mantida em torno de 38 a 47% para garantir a qualidade do malte (BOTELHO, 2009).

A maltagem é finalizada com o aumento da temperatura, que pode variar entre 85°C a 200°C, interrompendo a atividade enzimática e obtendo assim diferentes tipos de maltes conforme o nível de caramelização dos açúcares e reações do tipo Maillard (HUGHES, 2001). Um dos indicadores de qualidade que diferencia os maltes é a cor, resultado do processo de maltagem, descrita nas unidades EBC (*European Brewery Convention*). A gama de cores dos maltes varia de 5 a 1600 EBC. A figura 2 apresenta a cor de algumas das diferentes variedades de maltes comumente utilizados na produção de cerveja (COGHE *et al.*, 2003).

Gráfico 1 – Caracterização de diferentes variedades de malte de acordo com a cor



Fonte: AGRARIA MALTE, 2018.

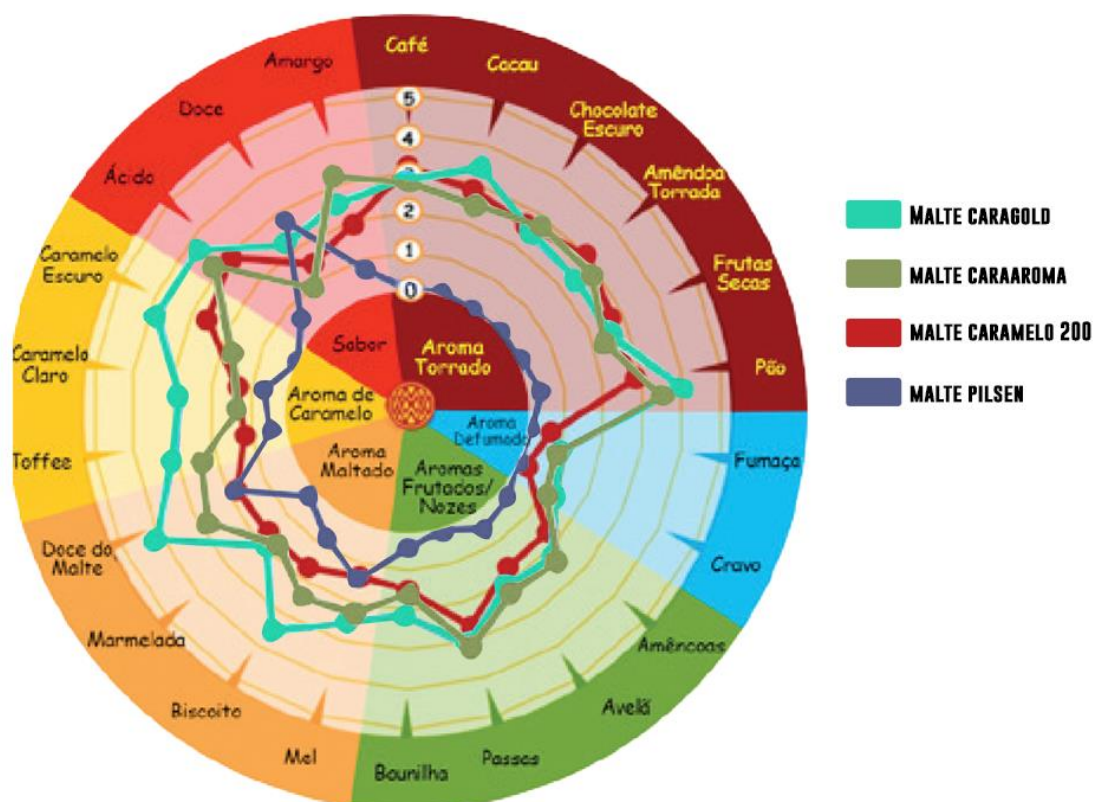
Dentre os diferentes tipos de malte usados na cervejaria, existem os maltes básicos, denominados tipo Pilsen, produzidos a partir de grãos não padronizados - como trigo, centeio, aveia, sorgo, milho, entre outros grãos -, e maltes especiais, produzidos através do processo de torrefação, em diferentes níveis, do malte de cevada (COGHE *et al.*, 2003).

3.2.1 Maltes Especiais

Cada variedade de malte obtido através da maltagem possui características particulares que geram a identidade organoléptica da cerveja. Dessa forma, o uso intencional de maltes especiais é atribuir cor, sabores e aromas característicos na cerveja. De acordo com Coghe *et al.* (2003), a intensidade dos aromas definidos como torrado e amargo aumenta com a intensidade da cor do mosto, enquanto a percepção do sabor doce diminui. Como resultado do tratamento térmico, os maltes especiais perdem sua atividade enzimática e, portanto, são tradicionalmente usados apenas em pequenas quantidades em comparação aos maltes claros, que são enzimaticamente ativos. Os maltes escuros também afetam o perfil dos compostos aromáticos no produto final (COGHE *et al.*, 2003; CARVALHO; GONÇALVES; GUIDO, 2016).

O malte especial CaraGold é produzido em alta temperatura de germinação – podendo chegar à 220°C -, e produz um aroma intenso e doce como caramelo, além de proporcionar uma cor que varia de dourado a âmbar mais escuro na cerveja. O malte CaraAroma é utilizado na produção de cervejas castanha e vermelho escura, e confere aroma de nozes torradas, caramelo escuro e frutas secas. A Figura 2 apresenta as características sensoriais obtidas com a utilização de algumas variedades de maltes (AGRARIA MALTE, 2018).

Figura 3 - Características sensoriais de diferentes tipos de malte



Fonte: AGRARIA MALTE, 2016.

3.2.2 Reação de Maillard

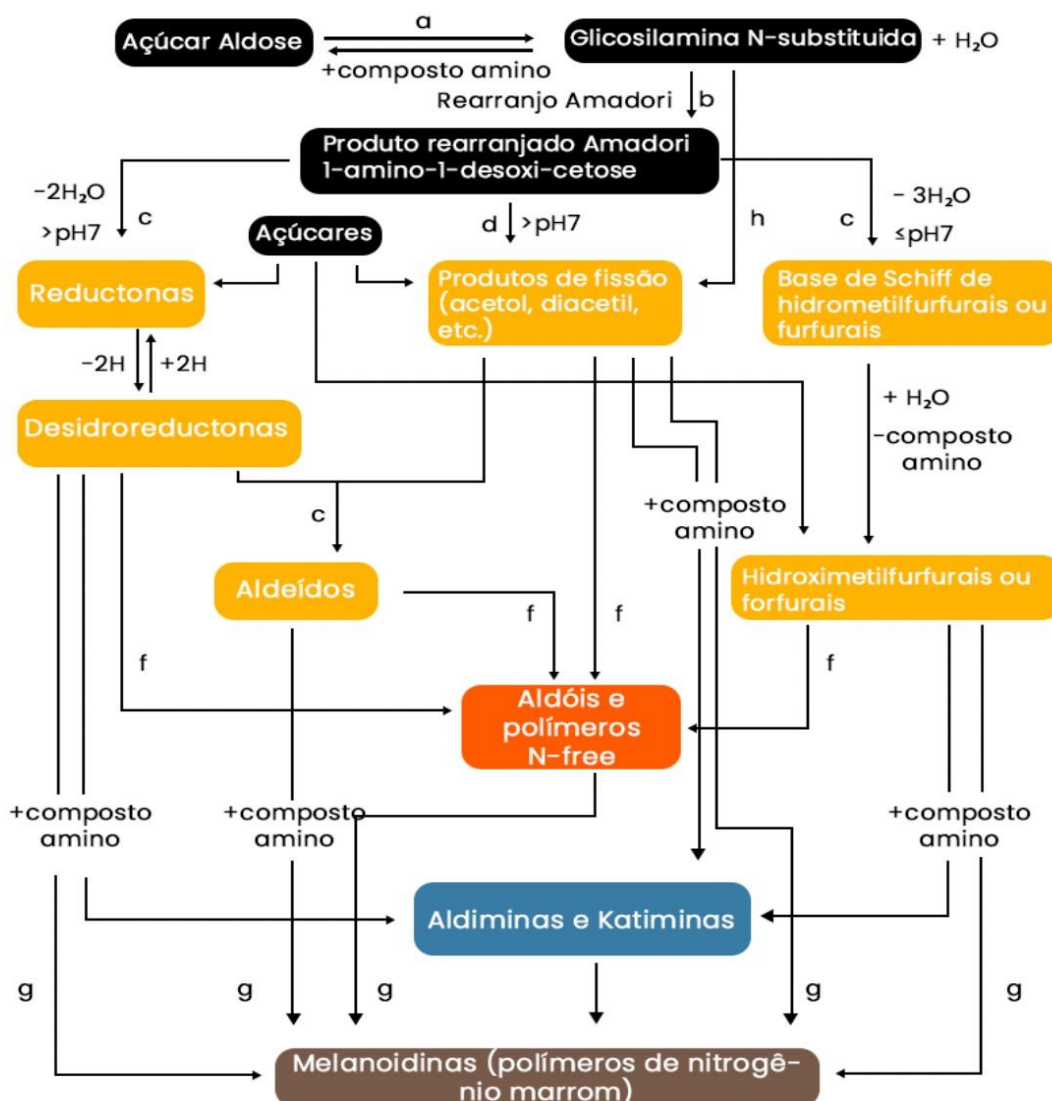
Os compostos de cor e sabor produzidos durante o tratamento térmico de maltes especiais são resultados de reações de escurecimento, também conhecidas como reações de Maillard (RM) (CARVALHO; GONÇALVES; GUIDO, 2016). Com o objetivo de distinguir a reação de Maillard de outras reações de escurecimento causadas pela polifenol oxidase e outras enzimas, esta também é denominada como reação de escurecimento não enzimático (FRIEDMAN, 1996).

A reação de Maillard que ocorre durante a produção de maltes especiais resulta em níveis mais baixos de açúcares fermentáveis e aminoácidos no mosto, sendo recomendado que o uso desse tipo de malte seja realizado apenas em pequenas quantidades. Estudos realizados por Coghe *et al.* (2005) indicam que os níveis mais baixos de nutrientes para a levedura em alguns mostos, afetam a taxa de fermentação, bem como a formação de importantes compostos ativos de sabor da cerveja.

Essa reação de escurecimento não enzimático abrange uma série de reações entre açúcares redutores e compostos com um grupo amino livre, formando uma variedade de compostos (Figura 3). As melanoidinas são os principais produtos finais dessa reação, definidos genericamente como moléculas nitrogenadas de elevada massa molecular, de coloração marrom, que contribuem para a textura, cor e sabor dos alimentos (ECHAVARRÍA, PAGAN, IBARZ; 2012).

As melanoidinas, estruturalmente, são compostos macromoleculares nitrogenados responsáveis pela coloração marrom produzida durante o processo. O conteúdo de melanoidinas nos alimentos não pode ser estimado pelo nosso conhecimento limitado de sua estrutura exata. Portanto, o conteúdo do produto intermediário 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) pode ser considerado um indicador da reação de Maillard (MARTINEZ-GOMES *et al.*, 2020).

Figura 4 – Diagrama de Hodge



Fonte: Adaptado de ARENA *et al.*, 2017.

A reação inicial entre um açúcar redutor e um grupo de proteína – NH₂ forma a base de Schiff instável (reação a), que então se reorganiza lentamente para formar o produto Amadori correspondente (reação b). Degradação do produto Amadori (reação c). Formação de compostos reativos de carbonila e α-dicarbonila (reação d). Formação de aldeídos de Strecker de aminoácidos e aminocetonas (reação e). Condensação aldólica de furfurais, reductonas e aldeídos produzidos na reação c, d e e sem a intervenção de compostos contendo NH₂ (reação f). Reação de furfurais, reductonas e aldeídos produzidos na reação c, d e e com NH₂-contendo derivados para formar melanoidinas (reação g). Formação mediada por radicais livres de produtos de fissão de carbonila a partir do açúcar redutor (via de Namiki) (reação h).

As melanoidinas podem ser divididas em duas classes, melanossacarídeos (esqueletos compostos principalmente de polissacarídeos) e melanoproteínas (esqueletos compostos principalmente de proteínas), dependendo da composição da matriz alimentar em que são

formadas (SILVA, 2019). Na cerveja, durante a RM, os açúcares redutores reagem com aminoácidos e grupos amino de peptídeos, dando origem a melanossacarídeos, que são responsáveis pelo sabor de malte e compostos de cor (CARVALHO; GONÇALVES; GUIDO, 2016).

Com base na natureza e quantidade desses compostos, estes podem conferir diferentes matizes de cores e sabores a uma cerveja e, portanto, afetam as características específicas do produto final. Por exemplo, maltes altamente secos e caramelo são caracterizados por corantes marrom claro de baixo peso molecular e o sabor é, em grande parte, resultado de produtos heterocíclicos de oxigênio da reação de Maillard, como pirenos, furanos e furanonas. Os maltes torrados são caracterizados por corantes castanhos intensos de alto peso molecular e seu sabor é principalmente o resultado de heterociclos contendo nitrogênio, como pirazinas, piridinas e pirróis (CARVALHO; GONÇALVES; GUIDO, 2016) (COGHE *et al.*, 2003).

3.3 LÚPULO

Humulus lupulus L., a planta do lúpulo, é uma trepadeira perene e dióica, pertencente à família *Cannabaceae* da ordem *Rosales* (STEVENS *et al.*, 2003). As inflorescências das plantas do sexo feminino (cones de lúpulo ou 'lúpulo') são utilizadas na indústria cervejeira - na forma de *pellets*, extratos, *in natura* ou de produtos de lúpulo - para dar à cerveja seu sabor e aroma característicos, além de conceder estabilidade ao produto (STEVENS *et al.*, 2003; WUNDERLICH *et al.*, 2005).

Há no mercado diversas variedades de lúpulo que diferem entre si pelo teor de α -ácidos e óleos essenciais. As variedades com maior teor de α -ácidos são consideradas de amargor, enquanto que aquelas com maior teor de óleos essenciais são aceitas como lúpulos de aroma. A variedade Saaz é empregada como um lúpulo de aroma de alta qualidade, originário da República Tcheca, sendo amplamente utilizado na indústria cervejeira (KROFTA *et al.*, 2011).

3.3.1 Composição química do lúpulo

Os cones de lúpulo são formados por vários componentes, dentre os quais: resinas, óleos essenciais, proteínas, polifenóis, aminoácidos, celulose e lignina (ALMAGUER *et al.*, 2014). A complexidade da composição química das flores de lúpulo se deve, em parte, à

diferença de composição dos componentes devido a fatores como a variedade do lúpulo, técnicas de cultivo, o grau de maturação no momento da colheita, além da secagem e armazenamento pós-colheita (VERZELE; KEUKELEIRE, 2013). A composição química média dos principais constituintes das inflorescências femininas de lúpulo está indicada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química média das inflorescências de lúpulo seco

Constituinte	%m/m
Celulose e Lignina	43
Resinas totais	15 – 30
Proteínas	15
Umidade	10
Cinza	8
Polifenóis	4
Óleos essenciais	0,5 – 3
Monossacarídeos	2
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1

Fonte: ALMAGUER *et al.*, 2014.

3.3.2.1 Resinas

As resinas são um dos principais constituintes das inflorescências de lúpulo, representando de 15% a 30% em peso dos cones e podem ser divididas em resinas macias e resinas duras. As resinas macias são solúveis em hexano e compreendem os ácidos amargos (α -ácidos e β -ácidos) e representam de 5% a 21% em massa dos cones de lúpulo. Os α -ácidos, também conhecidos como humulonas, contribuem para o gosto amargo da cerveja, favorecendo o equilíbrio sensorial com o adocicado dos açúcares do malte e a refrescância da bebida (PALMER, 2017). As lupulonas (β -ácidos) e algumas resinas macias não caracterizadas correspondem à fração β das resinas macias e representam de 5% a 15% do total de resinas. As lupulonas auxiliam na estabilidade química e sensorial da cerveja, por possuírem ação antimicrobiana, atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH e inibição da peroxidação lipídica (KARABÍN *et al.*, 2013; TAGASGIRA; WATANABE; UEMITSU, 1995; SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

A maior parcela da composição das resinas duras se mantém desconhecida (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019). Entretanto, sabe-se que as resinas duras são a

fração da resina total que é solúvel em metanol e éter dietílico e insolúvel em hexano e hidrocarbonetos parafínicos (BRIGGS *et al.*, 2000). As resinas duras- α possuem capacidade de reagir com solução de acetato de chumbo e formar um sal insolúvel. As resinas duras- β representam a maior parte da resina dura total e na presença de acetato de chumbo, formam sais de chumbo solúveis (BURTON; STEVENS, 1965). A resina dura- β é composta pelo polifenol xanthohumol e outras 13 chalconas relacionadas. No entanto, xanthohumol ocorre em concentrações cerca de 100 vezes maior quando comparado às outras chalconas presentes no lúpulo (STEVENS; PAGE, 2004).

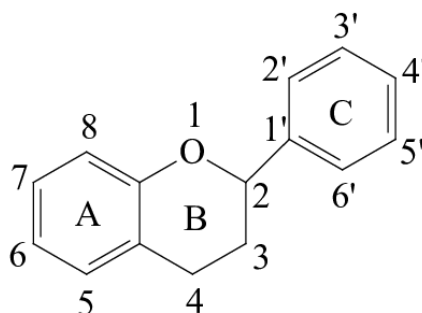
3.4 POLIFENÓIS

Os polifenóis compreendem um dos maiores grupos de metabólitos vegetais e são uma parte importante da dieta humana. São compostos de ocorrência natural encontrados principalmente em frutas, vegetais, cereais e bebidas (SPENCER *et al.*, 2008). São moléculas que geralmente estão envolvidas na defesa contra a radiação ultravioleta e agressão por patógenos (BECKMAN, 2000).

Os polifenóis podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de anéis fenólicos que possuem e dos elementos estruturais que ligam esses anéis, sendo as principais classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (SPENCER *et al.*, 2008).

O grupo dos flavonoides apresenta uma estrutura básica que consiste em dois anéis aromáticos A e C, ligados por uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de anel aromático (Figura 4). Variações na substituição do anel B resultam nas subclasses de flavonoides. As substituições nos anéis A e C derivam os diferentes compostos em cada classe (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; MANACH *et al.*, 2004).

Figura 5 - Estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006.

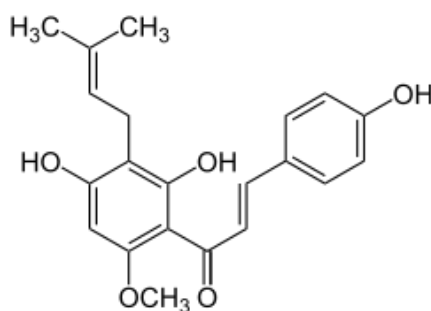
Os flavonoides compreendem o grupo mais comum de polifenóis possuem estrutura constituída por dois anéis aromáticos, ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo e normalmente são responsáveis pelas cores atraentes das flores, frutos e folhas. Existem mais de 4000 variedades de flavonoides, dentre os quais estão os flavonoides pré-alquilados ou prenilflavonóides que combinam a fração flavonoide e uma cadeia lateral lipofílica do radical prenil (GROOT; RAUEN, 1998).

Quase todos os polifenóis exibem propriedade antioxidante, constituindo a base dos seus possíveis efeitos benéficos à saúde. Pesquisas e estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação inversa entre o risco de doenças degenerativas e a ingestão de uma dieta rica em polifenóis (GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2005). Os prenilflavonóides, em particular, exibem potente atividade antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória, e ainda inibem a síndrome respiratória aguda (SCHNEIDEROVÁ; ŠMEJKAL, 2015). Nesse sentido, o xanthohumol, que é um prenilflavonóide, tem sido considerado o polifenol mais potente do lúpulo. Devido ao seu caráter mais lipofílico, proveniente do radical prenil, este, possivelmente, possui uma maior bioatividade quando comparado a outros polifenóis em concentrações semelhantes presentes na cerveja (STEVENS *et al.*, 2003).

3.5 XANTHOLUMOL

O xanthohumol (Figura 5) é um prenilflavonóide do tipo chalcona, possui tonalidade amarela alaranjada, massa molar de 354 g. mol⁻¹, ponto de fusão em 172°C e baixa solubilidade em água (1,3 mg. L⁻¹) (KARABIN *et al.*, 2013) (VERZELE, 1986). Essa classe de compostos não está bem representada na dieta humana, sendo a principal fonte alimentar desse flavonóide a cerveja (STEVENS; TAYLOR; DEINZER, 1999).

Figura 6 – Estrutura química do Xanthohumol



Fonte: DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019.

Xanthohumol é sintetizado nas glândulas das inflorescências femininas (Figura 6) e, discretamente, nas glândulas de folhas jovens. Sua distribuição é restrita à espécie *H. lupulus L.*, sendo o principal prenilflavonóide dos cones de lúpulo, representando de 0,1 a 1% em peso seco (STEVENS; PAGE, 2004). No entanto, a concentração de xanthohumol não alcança 0,1 mg. L⁻¹ em cervejas comerciais, isso é equivalente a um rendimento abaixo de 5% durante o processo de produção (WUNDERLICH *et al.*, 2005). Na Figura 06, destacam-se ainda as glândulas de lupulina onde o xanthohumol é produzido.

Figura 7 – Glândulas de lupulina das inflorescências femininas da planta de lúpulo



Fonte: STEVENS, PAGE, 2004.

Intelmann, Haseleu e Hofmann (2009) analisaram compostos do lúpulo com alta seletividade usando o espectrômetro de massa triplo quadrupolo operando em modo MRM, em que foram obtidas, em cervejas comerciais, concentrações de xanthohumol de até 0,14 mg. L⁻¹. Essa técnica permite que o isoxanthohumol e o xanthohumol sejam detectados,

simultaneamente, em uma única cromatografia líquida de alta performance (HPLC), além da possibilidade de serem executadas em amostras de cerveja sem que haja procedimentos de limpeza (INTELMANN; HASELEU; HOFMANN, 2009).

A quantidade de xanthohumol na cerveja é consideravelmente menor quando comparado à fração de xanthohumol presente no lúpulo devido, em parte, à isomerização térmica de chalconas em flavonas que ocorre no processo de fervura durante a fabricação da bebida (STEVEN; PAGE, 2004).

O produto da isomerização, isoxanthohumol (IXN), possui solubilidade consideravelmente maior, no entanto, seus efeitos biológicos são menos promissores (GERHÄUSER *et al.*, 2002). Já o xanthohumol tem sido relacionado à prevenção de várias doenças associadas ao estilo de vida como diabetes, osteoporose, hipertensão, além de propriedades quimioprotetoras e anticarcinogênicas. Estudos *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que xanthohumol possui amplo espectro de mecanismos preventivos em várias linhas celulares de câncer (MAGALHÃES *et al.*, 2009). Na Tabela 2, apresentam-se alguns dos principais resultados dos estudos realizados nos últimos anos sobre os benefícios de xanthohumol para a saúde.

Tabela 2 – Benefícios de Xanthohumol para a saúde

Atividade	IC₅₀*	Observações	Referência	
Anticancerígeno	Câncer do sistema respiratório	05 - 25 µM	Reduz a viabilidade celular e a proliferação das células cancerígenas	SLAWINSKA-BRYCH <i>et al.</i> , 2016
	Leucemia	51 µM	Aumenta apoptose Diminui a invasão	HARIKUMAR <i>et al.</i> , 2010
	Carcinoma Hepatocelular	5 µM	Diminui a viabilidade celular, a formação de colônias e a capacidade de confluência	KUNNIMALAIYAAN <i>et al.</i> , 2015
	Câncer de mama	10, 20 µM	Diminui a viabilidade celular	YOO <i>et al.</i> , 2014
	Câncer de próstata	20, 40 µM	Diminui a viabilidade celular Aumenta apoptose	DEEB <i>et al.</i> , 2010
	Gioblastoma	25 µM	Diminui a viabilidade celular Aumenta apoptose	CHEN <i>et al.</i> , 2016
Anti- HIV	0,82 µg / ml	Inibição dos efeitos citopáticos induzidos pelo HIV-1	WANG <i>et al.</i> , 2004	
	1,28 µg / ml	Produção do antígeno p24 viral		
	0,50 µg / ml	Transcriptase reversa nos linfócitos C8166 na concentração não citotóxica.		
Antimicrobiano	-	Concentração inibitória mínima (CIM) semelhantes aos antibióticos comumente usados	CERMAK <i>et al.</i> , 2017	
Antioxidante	-	Valores equivalentes ao polifenônio 60 e muito superiores aos das vitaminas C e E	YAMAGUCHI; SATOH-YAMAGUCHI; ONO, 2009	

Fonte: Elaborado pela autora.

*Concentração mínima necessária para inibir 50% de uma função biológica específica.

Apesar de baixa solubilidade em água, concentrações farmacológicas relevantes podem ser alcançadas pela administração oral de alimentos funcionais enriquecidos com xanthohumol, por exemplo, cerveja enriquecida com xanthohumol, chá, suco de frutas, alimentos sólidos (como menohop® (Metagenics, San Clements, CA, EUA). No entanto, ainda são necessários muitos estudos para desenvolver o xanthohumol como um medicamento confiável para aplicações terapêuticas específicas (LIU *et al.*, 2015).

Estudos recentes, em humanos, têm sido promissores. Munoz-Garcia *et al.* (2021) sugerem que a ingestão de cerveja sem álcool pode amortecer a resposta imune de células, como macrófagos, após a estimulação de lipopolissacarídeos. Os resultados de Munoz-Garcia *et al.* (2021) também sugerem que o xanthohumol interfere nas cascatas de sinalização do Receptor tipo pedágio (TLR).

Jung *et al.* (2022) avaliou a ingestão oral, única e aguda, de 0,125 mg de xanthohumol em humanos saudáveis, dosagem baseada na quantidade de xanthohumol encontrada em aproximadamente 500 ml de cerveja. Os resultados obtidos por Jung *et al.* (2022) sugerem que 1 hora após sua ingestão, o xanthohumol é absorvido pela corrente sanguínea, onde se liga, pelo menos em parte, aos monócitos amortecendo a resposta imune ao ácido lipoteicoico em humanos.

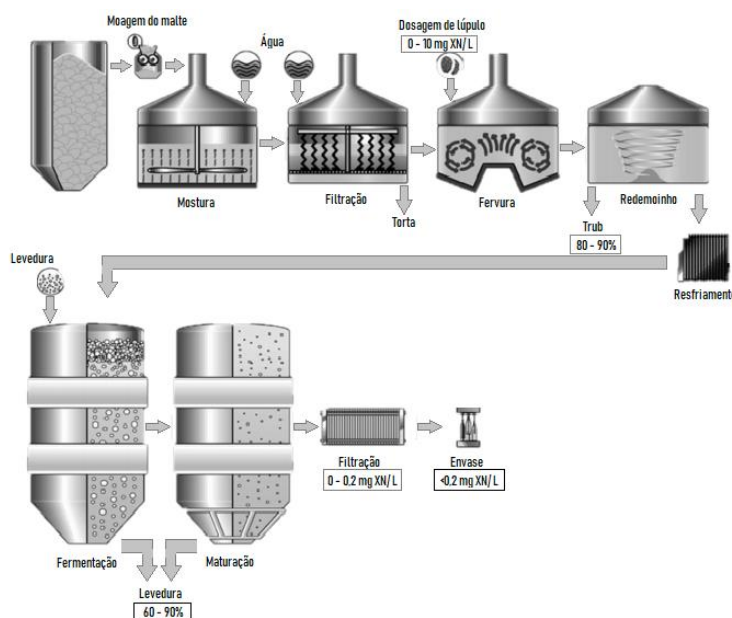
Bradley *et al.* (2020) demonstrou a segurança e a tolerabilidade de 24 mg de XN diariamente por 8 semanas em um ensaio clínico de fase I controlado por placebo. O protocolo do estudo de fase II projetado para medir o perfil de segurança e tolerabilidade do XN durante um período de 8 semanas em adultos com doença de Crohn (DC) clinicamente ativa foi elaborado por Langley *et al.* (2022). Onde o XN demonstrou efeitos reguladores na permeabilidade intestinal, redução da produção de citocinas inflamatórias por meio de ações inibitórias e modulação do microbioma intestinal por meio de sua atividade prebiótica, sugerindo que o XN impacte positivamente a atividade clínica na doença de Crohn de maneira segura por meio de várias vias mecânicas relevantes.

3.5.1 Perdas de xanthohumol durante o processo de produção da cerveja

É importante conhecer o processo de fabricação para compreender melhor o comportamento do xanthohumol durante a produção da cerveja (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

Os processos fundamentais da fabricação de cerveja (trituração, mostura, ebulição, fermentação, maturação, filtração e engarrafamento) e as perdas de xanthohumol em cada fase do processo são ilustrados na Figura 7.

Figura 8 – Fluxograma da produção de cerveja e perdas de xanthohumol



Fonte: Adaptado de WUNDERLICH *et al.*, 2005.

Além da isomerização, outras barreiras para a produção de cervejas com altos teores de xanthohumol são sua baixa solubilidade em água e em cerveja, $1,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente (KARABIN *et al.*, 2013); e o fato do xanthohumol não dissolvido no mosto ser removido com o trub, causando perdas significativas desse polifenol (STEVENS; TAYLOR; DEINZER, 1999). Devido a essas perdas, as cervejas comerciais possuem teor de xanthohumol de aproximadamente $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (WUNDERLICH *et al.*, 2005; INTELMAAN; HASELEU; HOFMANN, 2009). Com o intuito de contornar esses problemas, pode ser realizada uma segunda adição de lúpulo ao mosto no final da fervura ou nas etapas frias do processo de fabricação (STEVENS; TAYLOR; DEINZER, 1999). Deste modo, Wunderlich *et al.* (2005) e Henley *et al.* (2014) obtiveram cervejas com teor de xanthohumol de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. De acordo com Wunderlich *et al.* (2005), é possível a produção de cervejas com teores de xanthohumol ainda mais altos, podendo chegar a $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Cervejas produzidas a partir de extrato de lúpulo obtido por extração de etanol,

seguido de extração supercrítica de dióxido de carbono, apresentaram alto conteúdo de isoxanthohumol, porém, apenas resíduos de xanthohumol ($<0,1$ mg/ L) (MARTIN BIENDL *et al.*, 2011). A adição de estabilizadores, especialmente polivinilpirrolidona (PVPP), está associada a uma considerável diminuição do teor de xanthohumol na cerveja (WUNDERLICH *et al.*, 2005).

O processo de filtração também provoca grandes perdas na concentração de xanthohumol, com isso, Forster *et al.* (2002) recomendam que a adição de xanthohumol seja realizada após a etapa de filtração. Ainda segundo Forster *et al.* (2002), este procedimento se limita à solubilidade de xanthohumol na cerveja e não está em conformidade com a lei alemã de pureza da cerveja.

O processo de fermentação também provoca redução do teor de xanthohumol na cerveja devido à incorporação do prenilflavonóide à levedura. Experimentos realizados por Wunderlich *et al.* (2005) mostraram que o enriquecimento da levedura com xanthohumol pela reutilização múltipla das células de levedura ocasiona redução das perdas de xanthohumol.

3.5.2 Variáveis significativas no processo de extração de xanthohumol

O processo de torrefação do malte gera substâncias que podem inibir a isomerização do xanthohumol durante a fervura do mosto de forma a aumentar o rendimento, além de melhorar a solubilidade e recuperação (WUNDERLICH *et al.*, 2005). Segundo Magalhães *et al.* (2011), a formação de complexos de xanthohumol com melanoidinas dos maltes coloridos, o protegem contra isomerização. Contudo, Wunderlich *et al.* (2005) não encontraram correlação entre a tonalidade da cerveja e o aumento do teor de xanthohumol de cervejas filtradas.

Magalhães *et al.* (2008) investigaram a influência de um produto de lúpulo enriquecido com xanthohumol no conteúdo de xanthohumol em cervejas claras e escuras durante todo o processo de fabricação da cerveja e observaram que a utilização de maltes escuros tiveram efeito positivo na inibição da isomerização de xanthohumol.

No entanto, de acordo com Forster *et al.* (2002), o uso de produtos de lúpulo enriquecidos com mais de 30% de xanthohumol não provocam um aumento na sua recuperação em cervejas filtradas convencionais. Não foram encontrados estudos que evidenciem diferenças na extração de xanthohumol com a utilização de diferentes formas comerciais de lúpulo, contudo com a instauração de cultivos bem sucedidos de lúpulo no Brasil, existe a possibilidade de maior utilização de lúpulo *in natura* durante o processo

cervejeiro.

A tecnologia “XAN”, desenvolvida por Wunderlich *et al.* (2005) possui patente aplicada e implica uma adição tardia de lúpulo enriquecido com xanthohumol e resfriamento rápido do mosto com o objetivo de inibir a isomerização. Essa técnica torna possível a obtenção de até 10 mg. L⁻¹ de xanthohumol para cervejas escuras filtradas produzidas, de acordo com a lei de pureza alemã, apenas com água, malte, lúpulo e levedura. Karabin *et al.* (2013) avaliaram a influência de temperaturas acima de 60°C na concentração de xanthohumol no mosto de lúpulo escuro, em que observaram efeito linear entre a temperatura e a diminuição da concentração de xanthohumol.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fermentados e Destilados, do Departamento de Química, no Laboratório de Química e Análise de Alimentos e Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Núcleo de Análise de Biomoléculas, localizados na Universidade Federal de Viçosa.

4.1 MATERIAL

Foi utilizado lúpulo da variedade Saaz, na forma de *pellet*, malte de cevada Agrária Pilsen como base para a produção das cervejas e maltes CaraAroma, Caramelo 200 e CaraGold para a avaliação da interferência do nível de torrefação do malte na concentração de xanthohumol na cerveja e levedura *Saccharomyces cerevisiae* T-58. Todos os insumos foram obtidos comercialmente.

4.2 PRODUÇÃO DE CERVEJA

Foram produzidas cervejas do tipo *Ale*, com a utilização de lúpulo da variedade Saaz e fermento T-58 de acordo com a metodologia adaptada de Machado Jr. *et al* (2019). As cervejas foram produzidas em escala piloto (18 L). Cada lote foi produzido a partir de 2,7 kg de malte de cevada Agrária Pilsen e 0,3 kg de malte torrado. Foram elaborados 4 tipos de mosto - cada um com 3 repetições - sendo 3 preparados com a utilização de maltes torrados e um mosto exclusivamente com malte Pilsen Agrária para ser utilizado como controle. Os mostos foram obtidos com as seguintes proporções:

Tratamento 1 (M1) – Elaborado com 100% de malte Pilsen Agrária

Tratamento 2 (M2) – Elaborado com 90% de malte Pilsen Agrária e 10% de malte Cararoma

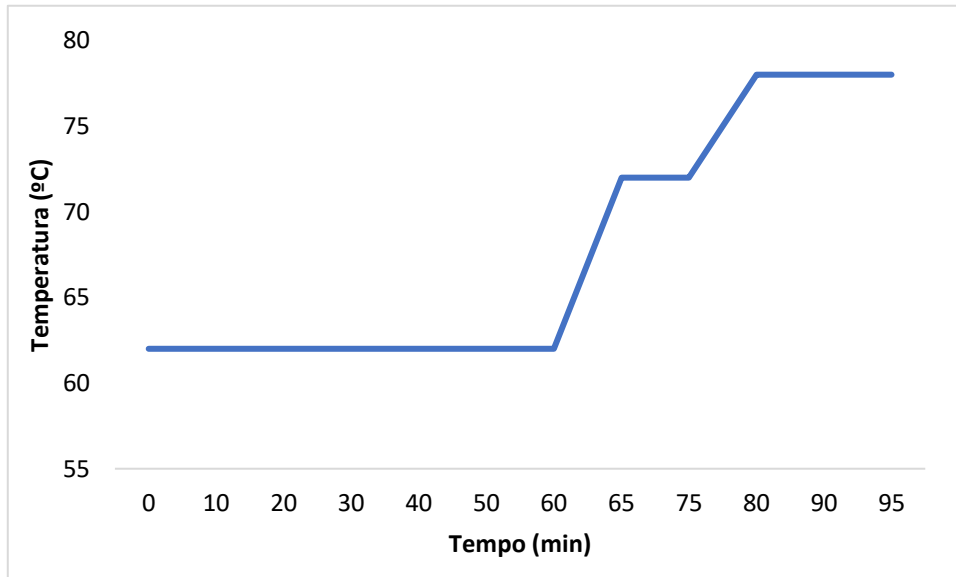
Tratamento 3 (M3) – Elaborado com 90% de malte Pilsen Agrária e 10% de malte Caramelo 200

Tratamento 4 (M4) – Elaborado com 90% de malte Pilsen Agrária e 10% de malte CaraGold

Os grãos foram moídos e diluídos em 10 L de água, a mistura foi inicialmente aquecida a 62° C por um período de 60 minutos, seguido por 10 minutos a 72° C e, por fim,

foi aquecida a 78°C por 15 min para filtração e recirculação como mostra o Gráfico 2.

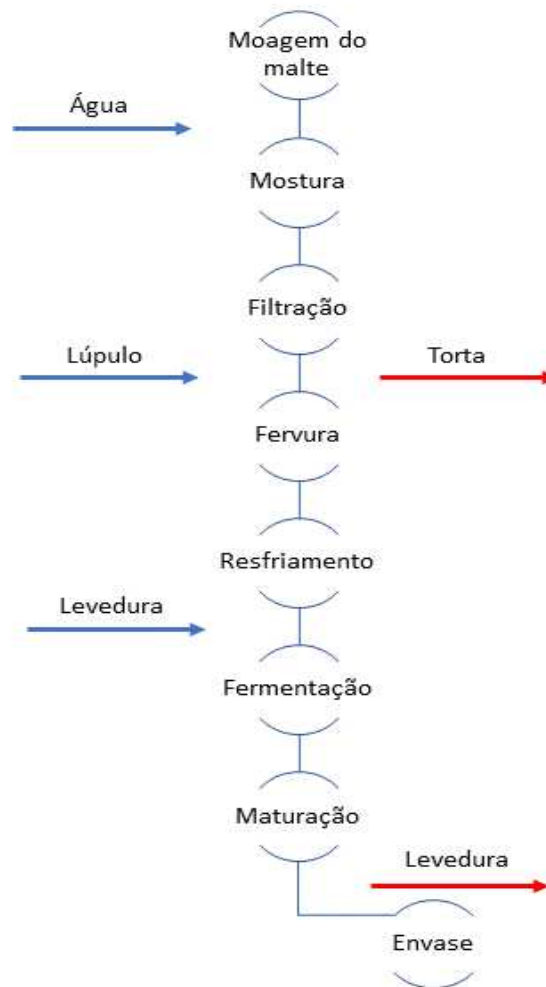
Gráfico 2 – Rampa de brassagem utilizada na produção de cerveja



Fonte: Elaborado pela autora com base em MACHADO JR, 2019.

Durante a ebulição do mosto, foram adicionados 25,2 g de lúpulo Saaz. O mosto foi fervido por 60 min, filtrado e resfriado. A levedura foi ativada em água a temperatura de 20°C sob agitação durante 5 minutos e, em seguida, inoculada. Após inoculação da levedura, o mosto foi fermentado por 7 dias a 20°C, seguido por um período de 14 dias de maturação a 0°C. Ao final da maturação a cerveja produzida foi envasada em garrafas de cor âmbar com capacidade de 0,6 L. O fluxograma do processo utilizado para a produção das cervejas está ilustrado na Figura 8.

Figura 9 – Fluxograma do processo



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 ANÁLISES FÍSICO – QUÍMICAS

4.3.1 pH

O potencial hidrogeniônico foi determinado através do método potenciométrico em medidor de pH (DM 21 Digimed ®) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, utilizando-se 15 mL de amostra a temperatura constante de 20°C (AOAC, 2005).

4.3.2 Graduação alcoólica

O teor alcoólico foi determinado a partir da densidade relativa a 20°C. Os valores de densidade relativa foram convertidos em teor alcoólico utilizando a tabela de Conversão de densidade relativa a 20°C/ 20°C em porcentagem de álcool do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.3.3 Densidade

A determinação de densidade das cervejas produzidas foi aferida com densímetro de massa específica calibrado para cervejas e apropriado para volume de 250 mL.

4.3.4 Sólidos Solúveis

A determinação de sólidos solúveis foi estimada pela medida de seu índice de refração através de refratômetro digital de bancada por leitura direta em °Brix.

4.3.5 Cor

O espectro de cores L^*a^*b foi medido nas amostras de cerveja para avaliar a cor final da bebida. O espectro de cores L^*a^*b especificado pela Comissão Internacional de Iluminação descreve um espaço tridimensional (medida absoluta), onde:

L^* (Luminosidade) – Varia entre o preto e o branco;

a^* (Cor oponente: magenta/ verde) – Descreve a posição entre as cores magenta e verde. Valores negativos indicam verde e valores positivos indicam magenta.

b^* (Cor oponente: Amarelo/ Azul) – Descreve a posição entre as cores amarelo e azul. Valores negativos indicam azul e valores positivos amarelo.

A cor das amostras foi obtida pela Equação 01, a partir de um colorímetro Unter Lab, modelo Colorquest (Reston, USA), e expressa em unidades de escala (SCU), semelhante à medição de cor em escala EBC.

$$Cor = L * a * b \qquad \text{Equação 01}$$

4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação dos compostos fenólicos totais das cervejas foram determinadas pela reação de oxirredução do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), conforme metodologia descrita por Sigleton e Rossi (1965), com algumas modificações.

As amostras de cerveja foram diluídas em água, numa proporção de 1:1, para realização da análise. Uma alíquota de 1 mL da cerveja, já diluída, foi misturada com 0,4 mL do reagente Folin-Ciocalteu previamente diluído com água destilada, 0,9 mL de uma solução de etanolamina e 1,1 mL de água destilada. As leituras, em duplicata, da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (TECNAL Espec-UV-5100) em comprimento de onda de 600 nm, após 20 minutos ao abrigo da luz.

Uma curva de calibração foi construída, a partir dos resultados obtidos para o padrão (ácido gálico) e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado pela interpolação dos resultados das absorbâncias na equação obtida. Os compostos fenólicos totais das cervejas foram representados como mg equivalente de ácido gálico por L de cerveja (mg GAE. L⁻¹).

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE XANTHOLUMOL

A quantificação de xanthohumol na cerveja foi realizada utilizando o método de cromatografia líquida (LC) em interface com espectrometria de massa adaptado de Intelmann, Haseleu e Hofmann (2009).

Para o isolamento dos compostos de referência, um extrato comercial de xanthohumol foi separado por meio de cromatografia líquida e separação em fase reversa para fornecer o composto alvo com pureza > 98%.

4.5.1 Preparo das amostras

Para a realização da análise por UPLC-MS/ MS foram adicionados 0,6 mL das amostras de cerveja em eppendorfs de 2 mL e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos para completa desgaseificação. Em seguida foram adicionados 1,4 mL de metanol, os eppendorfs foram homogeneizados em vórtex por 60 segundos e deixados em ultra freezer à temperatura de 80°C por 40 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos em centrífuga. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo

eppendorf, filtrado em filtros de 0,22 μm e, por fim, foram adicionados 0,5 mL em vials de 1,5 mL para análise.

4.5.2 Cromatografia líquida em interface com espectrometria de massa

As análises de xanthohumol foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS utilizando um equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo, modelo 6430 Agilent Technologies. Foi utilizado, também, uma coluna ZorbaxEclipse Plus C18 (1,8 μm , 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8 μm (Agilent).

Foi utilizada fase móvel composta por (A) ácido fórmico aquoso 0,5% e (B) acetonitrila com ácido fórmico 0,5%. O experimento foi iniciado com a injeção de 5 μL de xanthohumol a 1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ como padrão. Depois de 1,5 minutos, uma alíquota (5 μL) da amostra de cerveja foi injetada (INTELMANN; HASELEU; HOFMANN, 2009).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

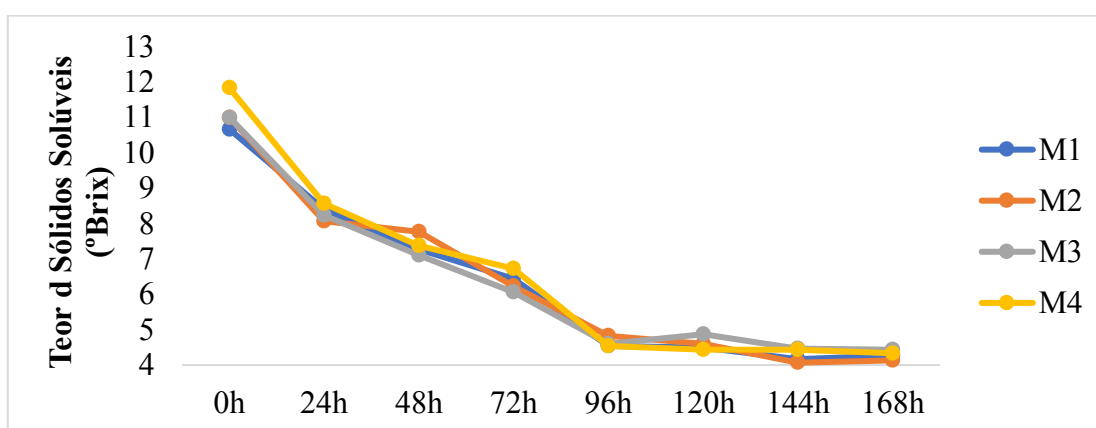
Posteriormente a execução dos experimentos, procedeu-se a realização das análises estatísticas. Os resultados obtidos na caracterização da cerveja foram apresentados como média e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e às médias dos tratamentos aplicado o teste Tukey ao nível de 5% significância. Os resultados do conteúdo fenólico total, conteúdo de xanthohumol e cor foram submetidos à análise de correlação (teste de correlação de Pearson) para determinar seus possíveis relacionamentos estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software Minitab versão 21.1.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

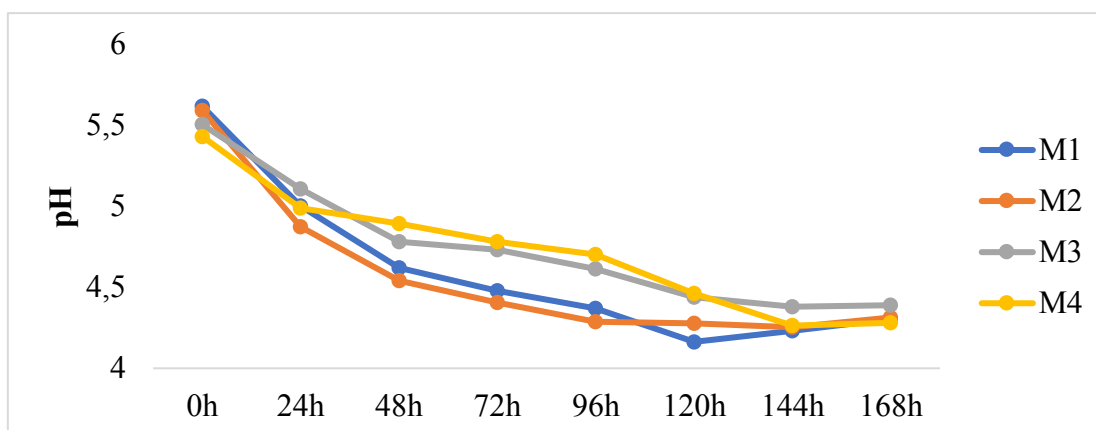
As cervejas produzidas com diferentes variedades de malte passaram por sete dias de fermentação. Depois disto, as cervejas passaram por um período de mais quatorze dias de maturação. Seguido do envase, em garrafas âmbar de 600 mL. O teor de sólidos solúveis e pH, apresentados nos Gráficos 3 e 4, respectivamente, foram acompanhados durante a fermentação.

Gráfico 3 – Curva de consumo de substrato para as cervejas em função do tempo de fermentação



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 4 – Variação de pH para as cervejas produzidas em função do tempo de fermentação



Fonte: Elaborado pela autora.

O pH inicial das fermentações foi, em média, 5,5, que é aproximadamente o pH da água utilizada para a produção da cerveja. Em todas as fermentações, houve queda do pH em relação ao seu valor inicial. Segundo Schmidell *et al.* (2001), essa queda é esperada, devido ao aumento da concentração de CO₂ e à produção de ácidos orgânicos que ocorre na fase anaeróbica do metabolismo das leveduras. A partir do Gráfico 03, observa-se uma rápida atenuação referente ao teor de sólidos solúveis. A partir 96h de fermentação, essas medidas se estabilizaram. Sendo a última medição feita com 168h de fermentação, marcando, em média, 4,3°Brix. Os resultados para o consumo de substrato e a variação de pH no tempo de fermentação estão de acordo com o que era previsto, e são um indicativo do final da fermentação.

A caracterização físico-química da cerveja foi realizada a partir dos parâmetros de teor alcoólico, teor de sólidos solúveis, cor, pH e densidade, e os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização física das cervejas

Tratamento	pH	Cor (SCU)	Teor de Sólidos Solúveis (Brix)	Teor alcoólico (°GL)	Densidade (g. cm ⁻³)
M1	4,30 ± 0,03 ^a	2600,16 ± 101,43 ^d	4,27 ± 0,12 ^a	4,84 ± 0,70 ^a	1,0080 ± 0,000 ^a
M2	4,31 ± 0,05 ^a	14990,6 ± 1041,67 ^a	4,13 ± 0,12 ^a	5,22 ± 0,73 ^a	1,0093 ± 0,001 ^a
M3	4,39 ± 0,06 ^a	11631,03 ± 629,48 ^b	4,43 ± 0,21 ^a	5,12 ± 0,47 ^a	1,0067 ± 0,006 ^a
M4	4,28 ± 0,01 ^a	7279,76 ± 926,42 ^c	4,33 ± 0,12 ^a	5,51 ± 0,59 ^a	1,0093 ± 0,003 ^a

Fonte: Elaborada pela autora.

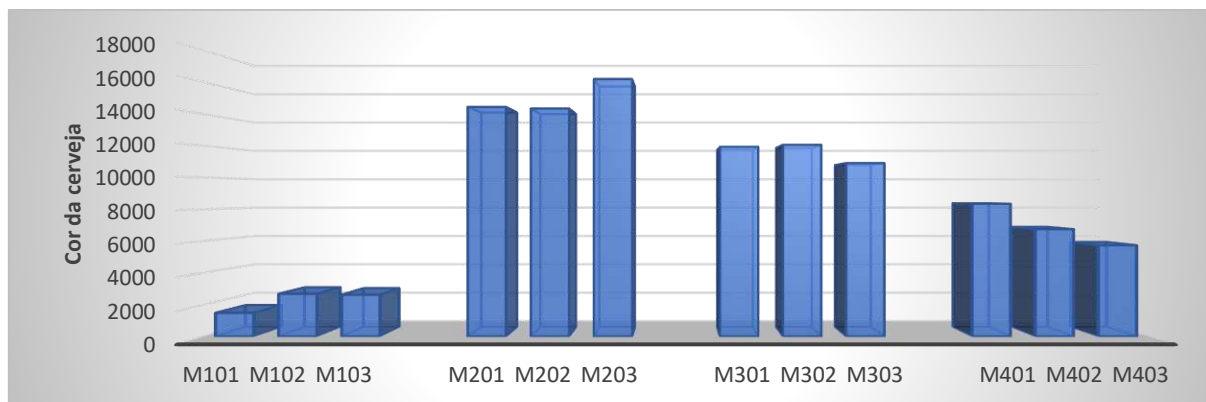
M1 – cerveja produzida com 100% de malte Pilsen; M2 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte CaraAroma; M3 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte Caramelo 200; M4 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte CaraGold. Letras minúsculas diferentes na coluna corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

Os resultados mostram que a adição de maltes especiais não influenciou os níveis finais de pH, TSS, densidade e teor alcoólico da cerveja. Não houve diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$). Como pode ser visto na Tabela 03, os valores dos níveis de densidade mantiveram as menores variações entre as cervejas produzidas, variaram de 1,0067 ± 0,006 a 1,0093 ± 0,003, respectivamente. O teor de sólidos solúveis e o teor alcoólico variaram entre 4,13 ± 0,12 a 4,43 ± 0,21 e 4,84 ± 0,70 a 5,51 ± 0,59, nessa ordem.

Os resultados obtidos estão de acordo com características descritas por Coelho Neto *et al.* (2020) e Goiania *et al.* (2016) para cervejas do tipo Pale Ale.

Não houve variação da cor da cerveja ($p < 0,05$) entre os lotes 01, 02 e 03 em nenhum dos tratamentos aplicados. O Gráfico 5 apresenta o resultado obtido para a cor de todas as cervejas analisadas.

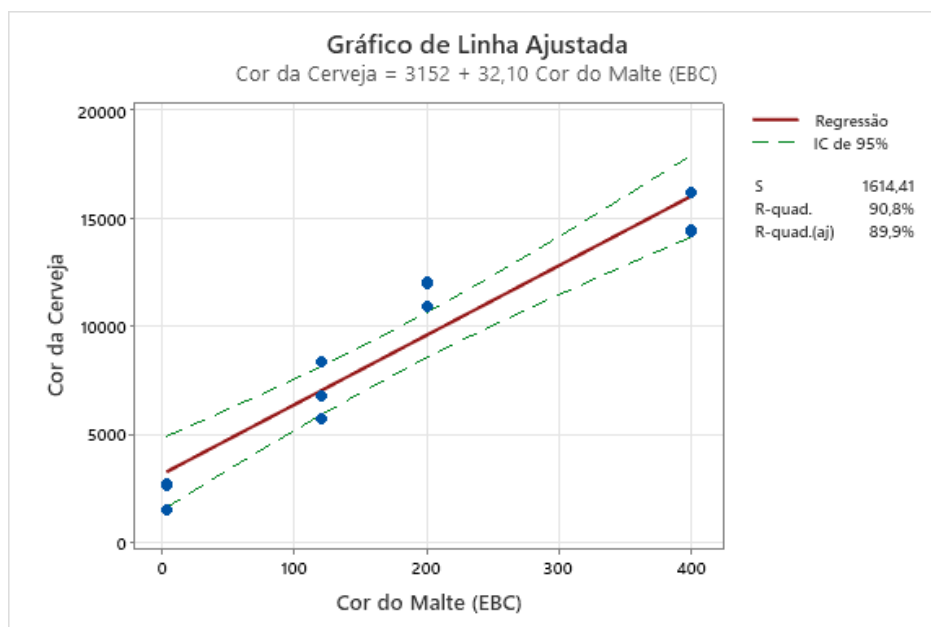
Gráfico 5 – Representação gráfica da cor das cervejas analisadas



Fonte: Elaborado pela autora.

A cor da cerveja expressa em unidades de escala, SCU, diferiu significativamente entre os tratamentos realizados, apresentando o maior valor para a amostra M2 ($14990,6 \pm 1041,67$), e o menor para a amostra controle M1 ($2600,16 \pm 101,43$). O nível de escurecimento da cerveja está relacionado com a cor do malte usado na produção do mosto, isso se deve ao processo de torrefação do malte que induz a polimerização dos compostos de baixo peso molecular (LMW), presentes nos maltes claros, em compostos de alto peso molecular (HMW) de coloração marrom intenso (> 300 kDa). Dessa forma, cervejas produzidas com maltes pálidos são caracterizadas por uma coloração marrom claro, enquanto as cervejas produzidas com maltes torrados possuem uma coloração mais intensa devido a esses compostos de alto peso molecular (COGHE *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2011). O Gráfico de Linha Ajustada (Gráfico 6) apresenta a relação entre os dados obtidos entre a cor do malte utilizado e a cor da cerveja produzida neste trabalho.

Gráfico 6 – Correlação entre a cor do malte e a cor da cerveja



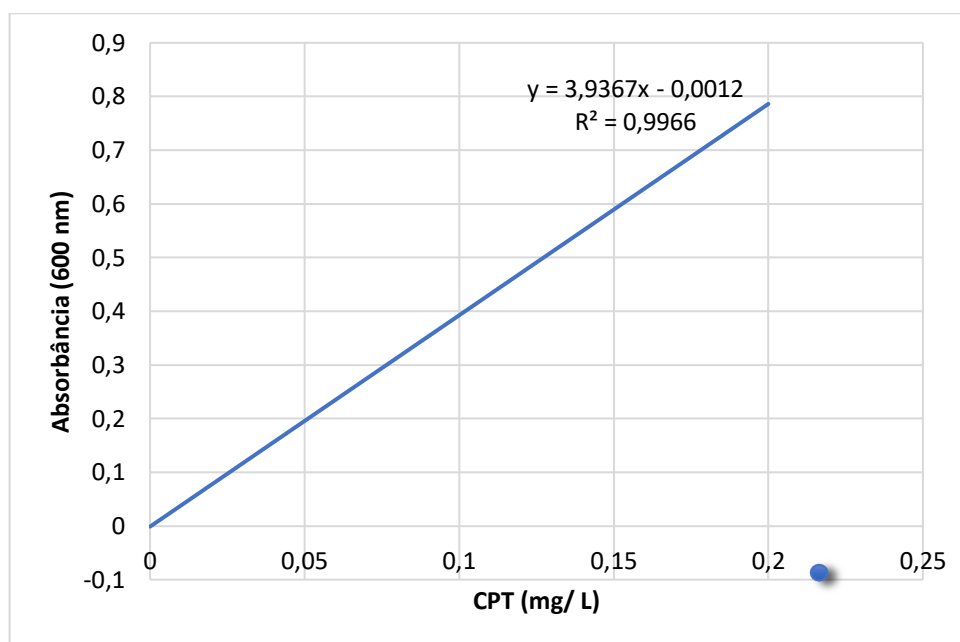
Fonte: Elaborado pela autora.

Observa-se uma forte correlação positiva entre a cor do malte e da cerveja ($R^2 = 0,908$). Essa relação pode ser explicada pela presença de melanoidinas, que são responsáveis pela cor e sabor característicos dos maltes especiais. Essas moléculas são responsáveis pela coloração do malte – em diferentes níveis -, que ocorre ao longo do processo de torrefação. Durante a mosturação, essas moléculas corantes se dissolvem no mosto cervejeiro, conferindo cor característica ao mosto e, como resultado, à cerveja. Resultados semelhantes foram encontrados por Gasior; Kawa-Rygielska; Kucharska (2020), Liguori *et al.* (2021) e Castro, Affonso e Lehman (2021) que observaram um aumento na intensidade da cor da cerveja com o acréscimo de maltes especiais de alta cor ou com o uso de maltes mais escuros.

5.2 CONTEÚDO DE FENOLICOS TOTAIS

Os teores de compostos fenólicos totais das cervejas produzidas foram determinados pela reação de oxirredução do reagente Folin-Ciocalteu através da interpolação, das medidas das absorbâncias, na curva de calibração (Gráfico 7) obtida para o ácido gálico, onde $y =$ concentração do ácido gálico e $x =$ absorbância, à 600 nm. O coeficiente de correlação (R^2) entre x e y no valor de 0,9966 comprovou a adequação da precisão. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por L (mg EAG. L^{-1}).

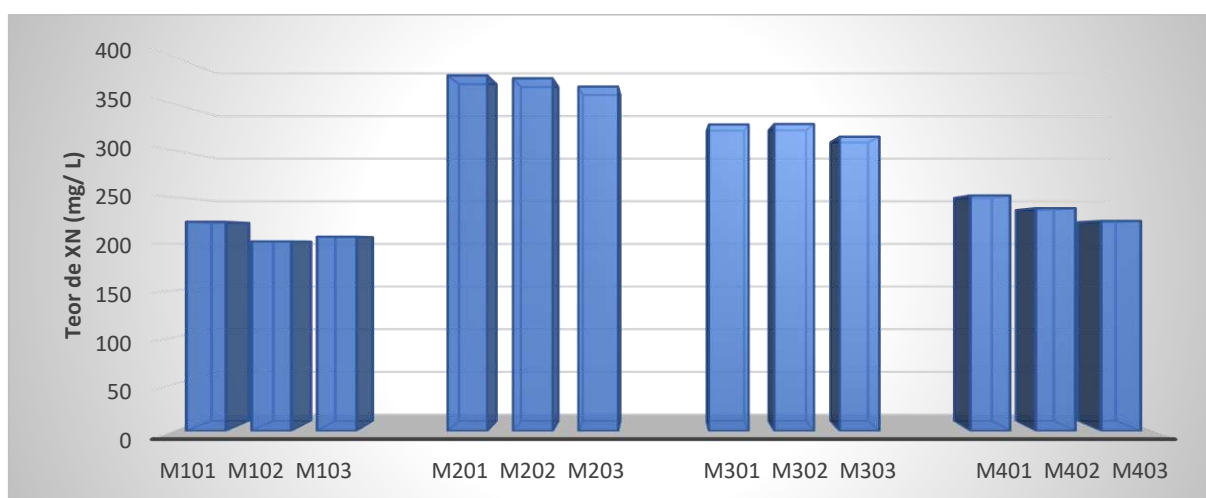
Gráfico 7 – Curva de calibração para determinação do CPT



Fonte: Elaborado pela autora.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para o conteúdo de compostos fenólicos, entre os lotes 1, 2 e 3, em todos os tratamentos aplicados. O Gráfico 8 apresenta o CPT de todas as cervejas analisadas.

Gráfico 8 – Representação gráfica do CPT



Fonte: Elaborado pela autora.

M1: Cerveja produzida com 100% de malte Pilsen (lotes 01,02 e 03); M2: Cerveja produzida com 10% de malte CaraAroma (lotes 01,02 e 03); M3: Cerveja produzida com 10% de malte Caramelo 200 (lotes 01,02 e 03); M4: Cerveja produzida com 10% de malte CaraGold (lotes 01, 02 e 03).

No entanto, foram observadas diferenças estatísticas significativas a nível de 95% de

confiança, entre todos os tratamentos realizados. A extração de CPT mostrou-se mais efetiva quando utilizado a composição de 90% de malte Pilsen e 10% de malte CaraAroma – M2. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise do conteúdo de fenólicos totais

Amostra	CPT (mg GAE.L ⁻¹)
M1	211,38 ± 10,96 ^d
M2	375,12 ± 6,23 ^a
M3	323,45 ± 7,72 ^b
M4	238,20 ± 13,61 ^c

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados estão apresentados como uma média de três repetições ± desvio padrão. Os valores médios apresentados em uma coluna, marcados com letras diferentes, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

As cervejas M2, M3 continham quantidades significativamente maiores do teor de fenólicos quando comparadas à amostra de controle, M1, e à amostra de cerveja comercial, M5. A cerveja produzida com a variedade de malte CaraAroma e Caramelo 200 apresentaram o maior teor de polifenóis totais entre as amostras (375,12 ± 6,23 mg GAE.L⁻¹) e (323,45 ± 7,72 mg GAE.L⁻¹), representando um aumento de, respectivamente, 77,5 e 53,0 % no teor total de compostos fenólicos quando comparadas à amostra de controle.

Gasior, Kawa-Rygielska e Kucharska (2020) obtiveram valores entre 176,02 e 397,03 mg GAE. L⁻¹ para o conteúdo de polifenóis em mostos com 10% de aditivo. Castro, Affonso e Lehman (2021) obtiveram concentrações de fenólicos totais variando entre 75,34 e 116,27 mg GAE. L⁻¹, em cervejas produzidas com 20% de maltes especiais. Segundo Pulido *et al.* (2003), o conteúdo de polifenóis na cerveja escura varia de 373,0 – 572,0 mg GAE. L⁻¹. A grande variedade de maltes especiais e as diversas concentrações que podem ser utilizadas, amplia o sortimento de resultados que podem ser obtidos para o CPT. No entanto, todos os estudos concluíram que o escurecimento da cerveja contribui para o aumento do teor de polifenóis totais.

Nas cervejas comerciais canadenses, o conteúdo de polifenóis estava entre 37,2 - 137,3 mg GAE. L⁻¹, com o valor mais alto para cerveja escura visto no estilo stout. Bratu *et al.* (2021), analisaram 10 marcas de cervejas produzidas na Romênia e obtiveram CPT variando entre 119,0 e 224,0 mg GAE. L⁻¹. As variações nos perfis fenólicos para diferentes marcas podem ser devido às diferenças de matérias-primas, processo de fabricação de cerveja (contato com O₂, tempo e temperatura de ebulição, tempo de maturação) ou possíveis

mudanças na composição fenólica durante o armazenamento (SOCHA *et al.*, 2017).

Segundo Paszkot *et al.* (2021), o teor de polifenóis durante o processamento da cerveja aumenta na fase de lupulagem e fermentação, enquanto diminui com o envelhecimento. Os compostos fenólicos contribuem para a formação de névoa na cerveja para formar compostos macromoleculares formando sedimentos. Essa sedimentação pode ser uma possível causa da diminuição no TPC durante o envelhecimento da bebida (ZHAO; CHEN; ZHAO, 2010).

O teor final de compostos fenólicos na cerveja depende também das matérias-primas utilizadas. Pesquisas anteriores mostraram que esses maltes especiais mais escuros contêm maiores concentrações de polifenóis do que os maltes torrados. As temperaturas empregadas durante os estágios iniciais de secagem são ótimas para a atividade enzimática e consequente liberação de alguns compostos fenólicos ligados às estruturas celulares. Essa liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao processo de malteação, onde ocorre o emprego de temperaturas mais elevadas, promove uma interação entre carboidratos e proteínas, gerando uma variedade de compostos intermediários, dentre eles, compostos fenólicos (CARVALHO; GUIDO, 2022). (MAGALHÃES *et al.*, 2011), e os mostos produzidos com a adição desses maltes especiais contêm uma maior concentração de polifenóis em comparação com mostos produzidos a partir de maltes menos torrados (GASIOR; KAWA-RYGIELSKA; KUCHARSKA, 2020). Portanto, seria de se esperar que as cervejas produzidas com adição de caramelo e malte torrado tivessem maior teor de polifenóis, isso é corroborado em nossos resultados e concorda com estudos anteriores que mostraram que a concentração total de polifenóis é maior em cervejas produzidas com maltes especiais em comparação com cervejas produzidas com maltes torrados de cor mais clara (HABSCHIED; LONČARIĆ; MASTANJEVIĆ, 2020).

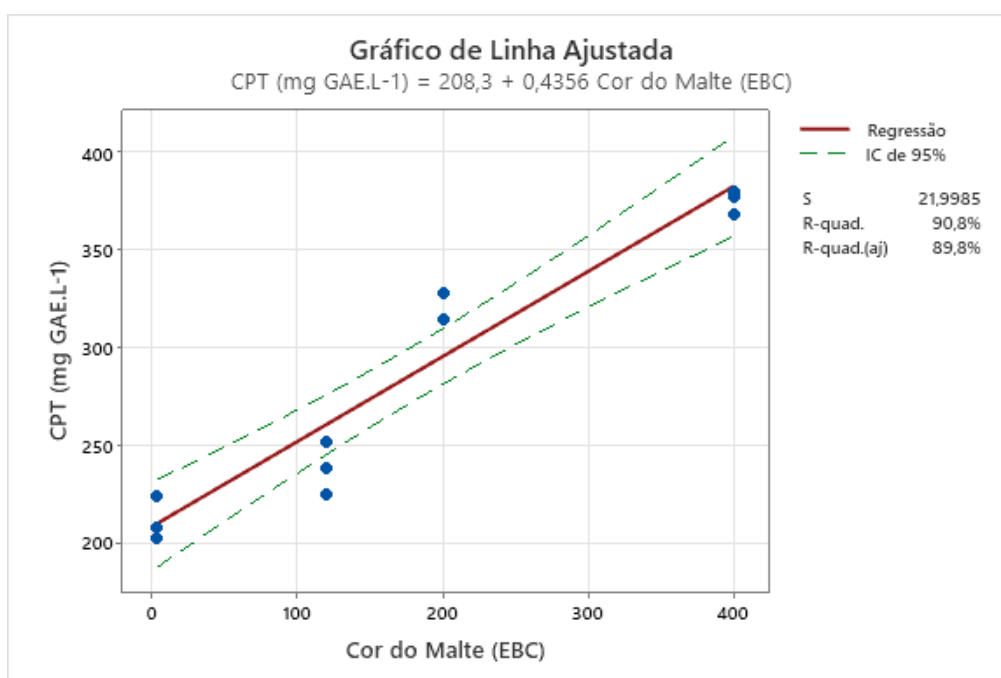
A maior concentração de compostos fenólicos em maltes torrados, e consequentemente, nas cervejas produzidas com essa matéria-prima se deve a alterações da matriz dos grãos durante os tratamentos térmicos (seca e torrefação) que podem levar a um tecido mais friável e a uma extração mais fácil de compostos fenólicos das camadas externas do grão. As temperaturas empregadas durante os estágios iniciais de secagem são ótimas para a atividade enzimática e consequente liberação de alguns compostos fenólicos ligados às estruturas celulares (CARVALHO; GUIDO, 2022). No entanto, tratamentos térmicos severos tendem a provocar efeito inverso, devido à desnaturação de enzimas e degradação de ácidos fenólicos (ÖZCAN; ALJUHAIMI; USLU, 2018).

Além disso, o conteúdo de compostos fenólicos das cervejas escuras é elevado devido ao conteúdo de melanoidinas e sua atividade antioxidante (HABSCHIED; LONČARIĆ;

MASTANJEVIĆ, 2020). Alguns autores relatam que os compostos fenólicos desempenham um papel importante na formação dessas melanoidinas e, conseqüentemente, uma certa quantidade desses compostos fenólicos permanece ligada à sua estrutura (SILVA, 2019).

A forte correlação encontrada entre a cor do malte e o teor de fenólicos totais (Gráfico 9) sugere que, as melanoidinas, responsáveis pela cor do malte, obtidas pelo processo de torrefação, contribuem para o aumento do CPT, e corrobora com a proposição feita por Silva (2019), de que os compostos fenólicos se ligam às complexas estruturas das melanoidinas, evitando, dessa forma, grandes perdas desses compostos durante o processo de produção da cerveja.

Gráfico 9 – Correlação entre a cor do malte e o índice de polifenóis totais na cerveja



Fonte: Elaborado pela autora.

Essa incorporação de compostos fenólicos nas melanoidinas já foi descrita para pão (ALVES; PERRONE, 2015) e café (PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012). O conteúdo de compostos fenólicos ligados nessas melanoidinas variou de 1,5 mg. 100 g⁻¹ para pão (ALVES; PERRONE 2015) a 370 mg. 100 g⁻¹ para café (PERRONE; FARAH; DONANGELO, 2012).

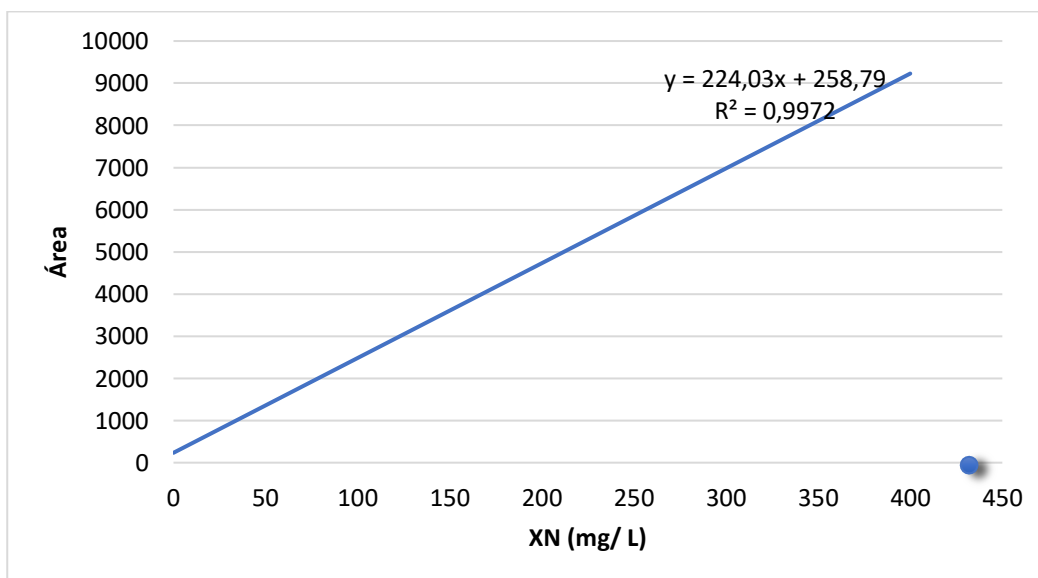
Silva (2019) relatou o conteúdo de compostos fenólicos em melanossacarídeos da cerveja. E observou que, em média, o teor total de compostos fenólicos ligados foi 80% maior na cerveja preta (126,2 µg. 100 mg⁻¹) em comparação com a cerveja clara (69,9 66 µg. 100 mg-1). De acordo com Silva (2019), esse resultado se deve, possivelmente, porque a produção

de cerveja escura inclui uma etapa adicional a altas temperaturas (torrefação do malte) o que pode aumentar a incorporação de compostos fenólicos nas melanoidinas. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho e indicam que a cor do malte, e consequente teor de melanoidinas, contribuem com o aumento de compostos fenólicos na cerveja.

5.3 TEOR DE XANTHUMOL

O teor de xanthohumol das cervejas produzidas foi quantificado utilizando o método de cromatografia líquida (LC) em interface com espectrometria de massa (LC-MS/MS), descrito por Intelmann, Haseleu e Hofmann (2009), com algumas modificações. A curva de calibração (Gráfico 10), onde y = área do pico e x = concentração de xanthohumol, expressa em miligramas de xanthohumol por L de cerveja ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), foi utilizada para a obtenção do teor de xanthohumol através da interpolação das medidas das áreas dos picos. O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9972.

Gráfico 10 – Curva de calibração para determinação do teor de xanthohumol



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Tabela 5, estão dispostos as amostras e suas respectivas áreas dos picos, identificados no LC-MS/MS, utilizados para determinação do teor de xanthohumol através da interpolação na curva de calibração.

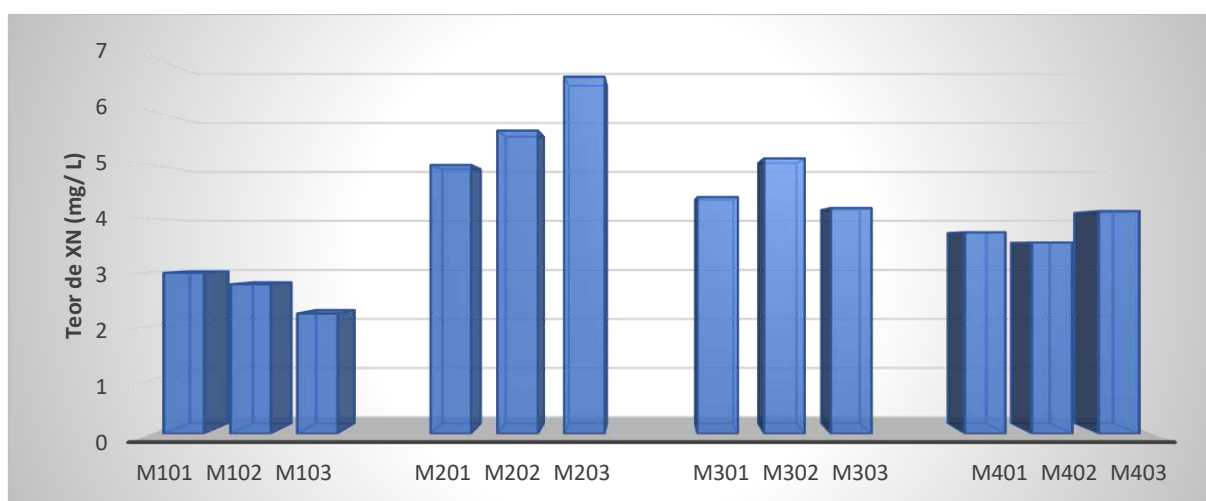
Tabela 5 - Áreas dos picos identificados no LC-MS/MS

Amostra	Precursor Mz	Product Mz	Background	Tempo de Retenção	Área
M101	355,2	299,1	877	14,52	929
M102	355,2	299,1	917	14,5	881
M103	355,2	299,1	884	14,49	759
M201	355,2	299,1	741	14,49	1378
M202	355,2	299,1	824	14,5	1521
M203	355,2	299,1	929	14,5	1745
M301	355,2	299,1	773	14,5	1244
M302	355,2	299,1	864	14,49	1405
M303	355,2	299,1	769	14,5	1199
M401	355,2	299,1	893	14,52	1098
M402	355,2	299,1	830	14,5	1055
M403	355,2	299,1	910	14,5	1186

Fonte: Elaborada pela autora.

O Gráfico 11 apresenta o teor de XN de todas as cervejas analisadas. Não foram observadas diferenças estatísticas, ao nível de 95% de confiança, para o conteúdo de XN, entre os lotes 1, 2 e 3, em todos os tratamentos aplicados.

Gráfico 11 – Representação gráfica do teor de xanthohumol



Fonte: Elaborado pela autora.

M1: Cerveja produzida com 100% de malte Pilsen (lotes 01,02 e 03); M2: Cerveja produzida com 10% de malte CaraAroma (lotes 01,02 e 03); M3: Cerveja produzida com 10% de malte Caramelo 200 (lotes 01,02 e 03); M4: Cerveja produzida com 10% de malte CaraGold (lotes 01, 02 e 03).

Os resultados do teor de XN nas cervejas obtidas são apresentados na Tabela 06. As amostras diferiram significativamente ($p < 0,05$) em termos do conteúdo do prenilflavonóide.

As cervejas foram caracterizadas por um alto teor de XN, na faixa de 2,667 – 5,755 mg.L⁻¹. Dentre os tratamentos aplicados nesse estudo, o maior teor de XN foi encontrado na cerveja M2, maltada com a variedade de malte CaraAroma, na proporção de 10% em peso, enquanto o menor teor de XN foi observado na cerveja M1, maltada com 100% de malte Pilsen.

Tabela 6 – Conteúdo de xanthohumol

Amostra	XN (mg.L ⁻¹)
M1	2,667 ± 0,39 ^d
M2	5,755 ± 0,83 ^a
M3	4,570 ± 0,48 ^b
M4	3,812 ± 0,30 ^{bc}

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados estão apresentados com uma média de três repetições ± desvio padrão. Os valores médios apresentados em uma coluna, marcados com letras diferentes, diferem estatisticamente ($p < 0,05$). M1 – cerveja produzida com 100% de malte Pilsen; M2 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte CaraAroma; M3 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte Caramelo 200; M4 – cerveja produzida com 90% de malte Pilsen e 10% de malte CaraGold.

Em comparação com o conteúdo de XN em cervejas testado por outros autores, nossos resultados são excelentes. O uso de maltes especiais permitiu uma boa extração de compostos coloridos do malte. À medida que a quantidade de melanoidina do mosto aumenta, a perda de XN durante a ebulição do mosto diminui. Isso indica a participação desses compostos na inibição da isomerização térmica das chalconas a flavonas (WUNDERLICH *et al.*, 2005).

Diversos estudos já investigaram o teor de XN em cervejas comerciais de diferentes países. Stevens *et al.* (1999) analisaram 13 cervejas quanto ao conteúdo de xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina. A pesquisa mostrou que o conteúdo total desses quatro compostos na cerveja estava na faixa de 0 – 4 mg. L⁻¹. As cervejas tipo Lager continham 0,009 - 0,034 mg. L⁻¹ de XN. As cervejas Stout e Porter apresentaram maior teor de XN das cervejas claras (0,34 mg. L⁻¹ e 0,69 mg. L⁻¹, respectivamente). O estudo do conteúdo de XN em 27 cervejas polonesas foi realizado por Tobola *et al.* (2014). Nessas cervejas, o teor de XN foi determinado como estando na faixa de 0,006 – 0,22 mg. L⁻¹, e os maiores resultados também foram registrados para cervejas escuras e cervejas claras não filtradas com teor de extrato superior a 12,5% *p/p*.

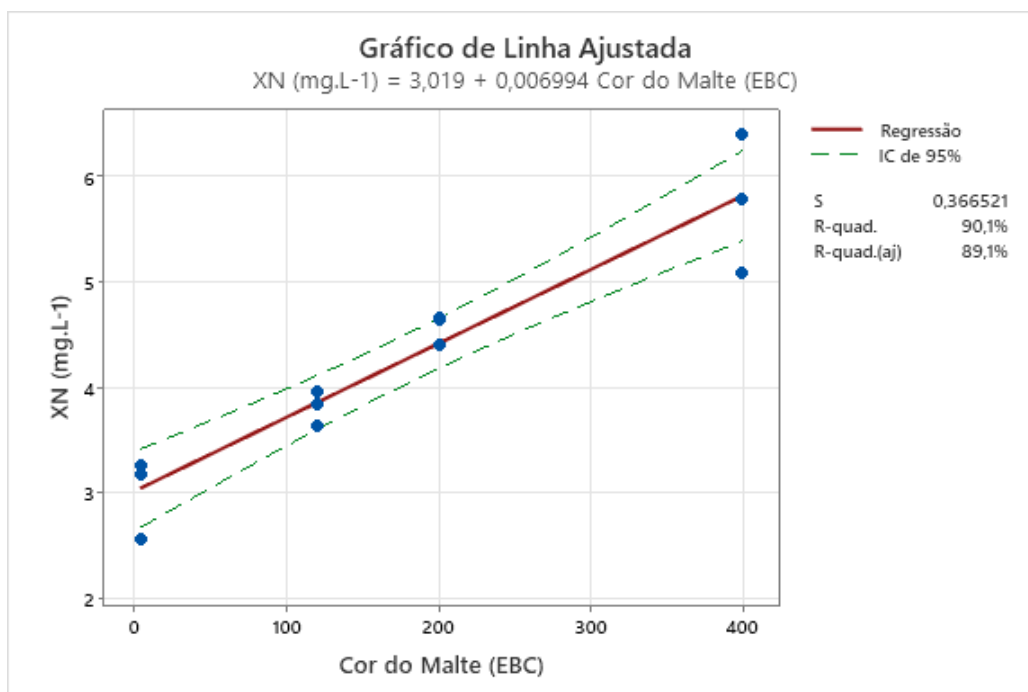
Os pesquisadores têm tentado repetidamente enriquecer a cerveja em XN usando uma adição de malte escuro, tecnologias de lúpulo modificadas, usando preparações ricas em XN dosadas em diferentes estágios da produção de cerveja, filtragem de salto e estabilização da cerveja com PVPP ou carvão ativado, reutilização de biomassa de fermento para fermentação

e mudanças no pH do mosto antes do salto (KARABIN *et al.*, 2013; WUNDERLICH *et al.*, 2005). Wunderlich *et al.* (2005) obtiveram cerveja com um teor de XN de 17,2 mg. L⁻¹ como resultado do uso de uma dose de 80 mg. L⁻¹ de XN e 10% de malte escuro. Em nosso experimento, obtivemos cerveja usando lúpulo convencional sem o uso de extratos de XN. É importante notar também que nossos resultados se aproximam do teor de XN apresentando atividade biológica (5 mg. L⁻¹). O maior teor de XN em cervejas escuras está provavelmente relacionado à presença de melanoidinas, que são produtos finais de alto peso molecular da reação de Maillard (WUNDERLICH *et al.*, 2005).

Segundo Magalhães *et al.* (2011), a formação de complexos de XN com melanoidinas de maltes torrados protegem o XN contra sua isomerização. Magalhães *et al.* (2008) observaram também uma diferença relevante entre a isomerização de XN em cervejas claras e escuras, 96% e 65%, respectivamente. Karabin *et al.* (2013) observaram que o efeito das melanoidinas na solubilidade de XN é significativamente maior do que o efeito de outros compostos de cor de malte.

A forte correlação entre a cor do malte e o conteúdo de XN (Gráfico 12) sugere que, as melanoidinas, responsáveis pela cor dos maltes especiais, contribuem para o aumento do teor de XN na cerveja, e está de acordo com Magalhães *et al.* (2011), que sugere que moléculas de XN se ligam às melanoidinas formando complexos que inibem a isomerização do XN nas etapas da produção de cerveja que ocorrem em altas temperaturas.

Gráfico 12 - Correlação entre a cor do malte e o teor de XN



Fonte: Elaborado pela autora.

Silva (2019) publicou o primeiro estudo que relata o conteúdo de compostos fenólicos ligados às melanoidinas da cerveja. Nesse estudo, foram observados apenas ácido ferúlico e caféico ligados aos melanossacarídeos da cerveja, no entanto, compostos como catequinas, proantocianidinas, flavononas e flavonóides não foram investigados neste estudo.

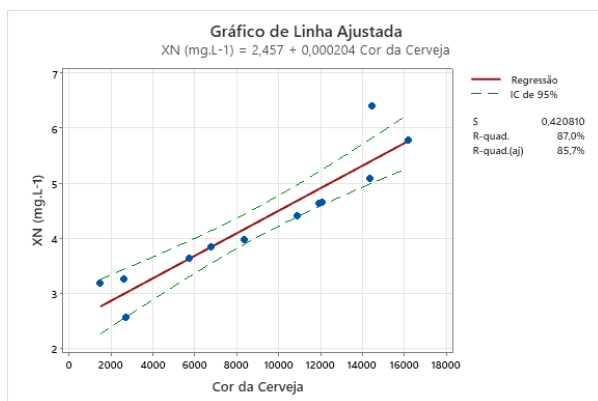
No gráfico de linha ajustada (Gráfico 12), observa-se uma forte correlação entre o teor de XN na cerveja e a cor do malte utilizado. No entanto, é possível notar, pelo coeficiente angular da equação da reta obtida ($a = 0,006994$), que a dependência do conteúdo de XN em relação à cor do malte é bastante inferior quando comparado com a dependência entre o CPT e a cor do malte, onde $a = 0,4356$ (Gráfico 09). É possível que essa diferença seja explicada, em parte, pela maior concentração de polifenóis na cerveja quando comparada à concentração de XN. Além disso, Silva (2019), Alves e Perrone (2015) e Perrone, Farah e Donangelo (2012) já demonstraram que os polifenóis se ligam à superfície das moléculas de melanoidinas. Enquanto que, Magalhães *et al.* (2011) sugere que a inibição da isomerização de XN ocorre devido à formação de complexos de XN com melanoidinas.

5.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E REGRESSÃO LINEAR

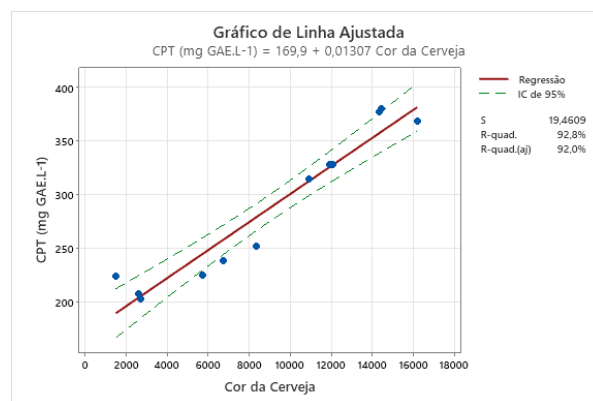
A análise de regressão linear múltipla foi usada para investigar a relação entre os

parâmetros estudados. Os resultados são apresentados no Gráfico 13 mostrando uma série de relações entre o conteúdo de xanthohumol, polifenóis e a cor de cervejas produzidos com o uso de diferentes tipos maltes especiais na composição da matéria-prima.

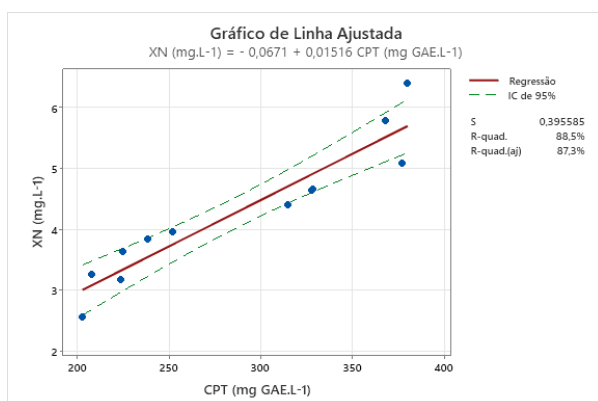
Gráfico 13 - Gráficos de dispersão para variáveis selecionadas. (a) Relação entre Cor e XN (teor de xanthohumol). (b) Relação entre Cor da cerveja e TPC (conteúdo de polifenóis). (c) Relação entre TPC e XN



(a)



(b)



(c)

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi observada uma forte correlação positiva entre a cor da cerveja e o teor de polifenóis (TPC) ($R^2 = 0,928$), entre a cor da cerveja e o teor de xanthohumol (XN) ($R^2 = 0,870$) e entre o teor de polifenóis (TPC) e a concentração de xanthohumol ($R^2 = 0,885$). A análise mostrou uma correlação significativa entre as variáveis analisadas.

Karabin *et al.* (2013) e Gasior, Kawa-Rygielska e Kucharska (2020) observaram correlações semelhantes ($R^2 = 0,9043$) entre a cor do mosto e o teor de XN com a utilização de maltes torrados de diferentes níveis (5-845 EBC), e ($R^2 = 0,93$) entre o teor de polifenóis (TPC) e o nível de índice de escurecimento do mosto expresso em unidades de absorvância.

Os índices de cor da cerveja são indicadores da presença de compostos da reação de Maillard derivados do tratamento térmico do malte, onde compostos α -dicarbonílicos formados no estágio avançado da reação de Maillard tem grande influência no tipo e na estrutura das melanoidinas de alto peso molecular responsáveis pela formação da cor (GASIOR; KAWA-RYGIELSKA; KUCHARSKA, 2020). Esses compostos também estão relacionados com a maior concentração do conteúdo de XN em cervejas escuras, devido à inibição da conversão de XN ao seu isômero IXN, que possui menor atividade biológica. Por fim, as melanoidinas também são responsáveis por um maior conteúdo de compostos fenólicos nas cervejas escuras (KARABIN *et al*, 2013; HABSCHIED, LONČARIĆ, MASTANJEVIĆ, 2020).

A análise da correlação entre as características examinadas permite demonstrar as dependências que são incorporadas pela participação de maltes especiais na composição do mosto fermentado, além de intensidade dessas dependências.

6 CONCLUSÃO

O uso de maltes especiais de diferentes níveis de torrefação, levou à obtenção de cervejas diversificadas quanto ao teor de polifenóis totais e xanthohumol. No entanto, o desenvolvimento do processo fermentativo se manteve constante. Dessa forma, as cervejas foram produzidas mantendo suas características gerais, e se diferenciando pelos atributos relacionados com a variedade de malte utilizado.

Observamos uma forte correlação ($R^2 > 0,90$) entre a cor do malte utilizado e a cor da cerveja. As reações de escurecimento não enzimáticas são responsáveis pela cor e sabor dos maltes torrados e, como resultado, das cervejas produzidas com esses insumos. O principal produto dessas reações, responsáveis pela cor dos alimentos, são as melanoidinas, moléculas nitrogenadas de coloração marrom e de alto peso molecular.

O conteúdo de polifenóis foi favorecido pelo uso de maltes especiais no processo de fabricação da cerveja. Foram encontradas correlações diretas entre o teor de polifenóis e a cor do malte. Observou-se que o escurecimento da cerveja, com a utilização de 10% de malte torrado, provocou um aumento de 77,5% na concentração de compostos fenólicos na cerveja. Sugere-se, que os polifenóis se ligam aos compostos de alto peso molecular formando durante a torrefação do malte.

As cervejas foram caracterizadas por um conteúdo de xanthohumol distintamente maior em comparação com as cervejas comerciais, ou cervejas produzidas por métodos convencionais sem enriquecimento com preparações ricas neste flavonoide prenilado. Os maltes escuros têm se mostrado eficientes para auxiliar na redução da conversão de xanthohumol em isoxanthohumol, que ocorre nas etapas realizadas a altas temperaturas. Essa inibição ocorre, em parte, devido aos complexos formados entre as melanoidinas dos maltes torrados e as moléculas de xanthohumol, que o protegem contra isomerização.

A análise da correlação entre as características examinadas permite demonstrar uma série de dependências que são introduzidas pela participação de maltes especiais na composição do mosto fermentado. A realização de tal análise é uma ferramenta valiosa que permite uma melhor visualização e compreensão das mudanças nos parâmetros físico-químicos do mosto relacionadas com a mudança na composição das matérias-primas. A cor do malte influencia diretamente o conteúdo total de polifenóis, o teor de xanthohumol e a cor das cervejas. Todas as dependências encontradas, estão relacionadas, em parte, com as desconhecidas moléculas de melanoidinas. Essa simultaneidade promove a forte correlação encontrada entre essas variáveis

Sugere-se novos estudos com a variedade de lúpulo Saaz para avaliar a sua influência na presença de xanthohumol do produto final. Novos trabalhos também devem ser direcionados objetivando a otimização da extração de xanthohumol, levando em consideração os diversos fatores que interferem na sua extração. Além da realização de análise sensorial para verificar a aceitação do produto por consumidores.

REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C. *et al.* Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- ALMAGUER, C. *et al.* Comparative study of the contribution of hop (*Humulus lupulus* L.) hard resins extracted from different hop varieties to beer quality parameters. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 2, p. 115-123, 2015.
- ALVES, G.; PERRONE, D. Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins. **Food Chemistry**, v. 185, p. 65-74, 2015.
- AMPARO, T. R. *et al.* Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1951-1954, 2018.
- ARENA, Simona *et al.* Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies. **Food Chemistry**, v. 219, p. 477-489, 2017.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.
- BARTH, J. *et al.* The Barth Report. Nuremberg: Barth-Hass group, 2018.
- BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. Cerveja: Qualidade, segurança e aspectos nutricionais. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n.1, p. 70-76, 1996.
- BETANCUR, M. *et al.* Factors influencing the choice of beer: A review. **Food Research International**, v. 137, p. 109367, 2020.
- BHATTACHARYA, S. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* and Other Oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. **Economic Botany**, v. 57, n. 1, p. 118-125, 2003.
- BOTELHO, Bruno Goncalves. Perfil e teores de amins bioativas e características físico-químicas em cervejas. 2009. . 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- BRADLEY, R. *et al.* Xanthohumol microbiome and signature in healthy adults (the XMaS trial): A phase I triple-masked, placebo-controlled clinical trial. **Trials**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2020.

- BRASIL. DECRETO No 6.871, de 4 de junho de 2009. **Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**, Brasília, mar, 2017.
Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm.
Acesso em: 20 jan. 2020.
- BRIGGS, D. E. *et al.* **Brewing: science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000.
- BRUNELLI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Physicochemical characterization of beer produced with honey. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, p. 19-27, 2014.
- BUCKWOLD, V. E. *et al.* Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. **Antiviral research**, v. 61, n. 1, p. 57-62, 2004.
- BURTON, J. S.; STEVENS, R. Evaluation Of Hops. Xi. The Hard Resin And Presence Of Hulupinic Acid. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 71, n. 1, p. 51-56, 1965.
- CARVALHO, D. O.; GONÇALVES, L. M.; GUIDO, L. F. Overall antioxidant properties of malt and how they are influenced by the individual constituents of barley and the malting process. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 15, n. 5, p. 927-943, 2016.
- CARVALHO, D. O.; GUIDO, L. F. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: technological strategies and beer styles. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131093, 2022.
- CASTRO, L. F.; AFFONSO, A. D.; LEHMAN, R. M. Impact of Specialty Malts on Wort and Beer Characteristics. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 137, 2021.
- CERMAK, P. *et al.* Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. **Apmis**, v. 125, n. 11, p. 1033-1038, 2017.
- CHANG, C. *et al.* Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.10, n. 3, p. 178-182, 2002.
- CHEN, P. *et al.* The miR-204-3p-targeted IGF2BP2 pathway is involved in xanthohumol-induced glioma cell apoptotic death. **Neuropharmacology**, v. 110, n. 1, p. 362-375, 2016.
- COCUZZA, S.; MITTER, W. Dry hopping - A study of various parameters. **Brewing and Beverage Industry International**, v. 4, n. 1, p. 70-74, 2013.
- COELHO NETO, D. M. *et al.* Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, 2020.
- COGHE, Stefan *et al.* Characterization of dark specialty malts: New insights in color evaluation and pro-and antioxidative activity. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, n. 3, p. 125-132, 2003.

- COGHE, Stefan *et al.* Impacto dos maltes especiais escuros na composição do extrato e na fermentação do mosto. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 1, p. 51-60, 2005.
- COGHE, Stefan *et al.* Development of Maillard reaction related characteristics during malt roasting. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 148-156, 2006.
- COLGATE, E. C. *et al.* Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. **Cancer letters**, v. 246, n. 1-2, p. 201-209, 2007.
- COLLIN, S. *et al.* Polyphenols and beer quality. **Natural products**, p. 2333-2359, 2013.
- DEEB, D. *et al.* Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalone present in hops, in human prostate cancer cells. **Anticancer research**, v. 30, n. 9, p. 3333-3339, 2010.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, J. B. de A. Use of concentrated worts for high gravity brewing by continuous process: new tendencies for the productivity increase. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2007.
- DUARTE, V. **Alimentos funcionais: faça do alimento seu medicamento e do medicamento, seu alimento.** 2 ed. Porto Alegre: Editora Artes e ofícios, 2007.
- DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR, S. Química do Lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.
- ECHAVARRÍA, A. P.; PAGÁN, J.; IBARZ, A. Melanoidins formed by Maillard reaction in food and their biological activity. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 4, p. 203-223, 2012.
- FORSTER, A. *et al.* Xanthohumol in Bier-Möglichkeiten und Grenzen einer Anreicherung. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, v. 55, n. 9/10, p. 184-194, 2002.
- FRIEDMAN, Mendel. Food browning and its prevention: an overview. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 44, n. 3, p. 631-653, 1996.
- GASIOR, J.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A. Z. Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3882, 2020.
- GROOT, H. de; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 249-255, 1998.
- GERHÄUSER, C. *et al.* Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 3, p. 369-377, 2002.
- GERHAUSER, C. *et al.* Cancer Chemopreventive Activity of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hop. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 11, p. 959-969, 2002.

GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1941-1954, 2005.

GOIANA, M. L. *et al.* Análises físico-químicas de cervejas artesanais pale ale comercializadas em Fortaleza, Ceará. *In: Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Gramado: FAURGS, 2016.

GOŁĄBCZAK, J.; GENDASZEWSKA-DARMACH, E. Ksantohumul i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne. **Biotechnologia**, v. 1, n. 88, p. 75-89, 2010.

GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 3, p. 281-290, 2005.

GUZINSKI, J. A.; SCHULZE, M. H. **Readily-dispersible lipidic hop extract for imparting hoppy aroma and flavor to beer**. US6242038B1, 13 set. 1994, 18 nov. 1997.

HABSCHIED, K.; LONČARIĆ, A.; MASTANJEVIĆ, Kr. Screening of polyphenols and antioxidative activity in industrial beers. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 238, 2020.

HARIKUMAR, K. B. *et al.* Modification of the cysteine residues in I κ B α kinase and NF- κ B (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF- κ B - regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 9, p. 2003-2013, 2009.

HENLEY, T. *et al.* American India Pale Ale matrix rich in xanthohumol is potent in suppressing proliferation and elevating apoptosis of human colon cancer cells. **International journal of food science & technology**, v. 49, n. 11, p. 2464-2471, 2014.

HIERONYMUS, S. **For the love of hops: The practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops**. Boulder, Colorado: Brewers publications, 2012.

INTELMANN, D.; HASELEU, G.; HOFMANN, T. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1172-1182, 2009.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2008. 1018p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

JUNG, F. *et al.* Oral intake of xanthohumol attenuates lipoteichoic acid-induced inflammatory response in human PBMCs. **European journal of nutrition**, v. 61, n. 8, p. 4155-4166, 2022.

KARABIN, M. *et al.* New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 98-102, 2013.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quimica nova**, v. 23, p. 108-112, 2000.

KROFTA, K. *et al.* Investigation of Czech hop varieties authenticity by means of chemical and genetic analyses. **Kvasny Prumysl (Czech Republic)**, v.57, n. 7-8, p. 296-234, 2011.

KUNNIMALAIYAAN, S. *et al.* Xanthohumol-mediated suppression of Notch1 signaling is associated with antitumor activity in human pancreatic cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 1395-1403, 2015.

LANGLEY, B. O. *et al.* Xanthohumol microbiome and signature in adults with Crohn's disease (the XMaS trial): a protocol for a phase II triple-masked, placebo-controlled clinical trial. **Trials**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2022.

LAWS, D. R. J. *et al.* Preparation of hop extracts without using organic solvents. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 83, n. 1, p. 39-40, 1977.

LIGUORI, L. *et al.* Influence of malt composition on the quality of a top fermented beer. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 6, p. 2295-2303, 2021.

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

LIU, X. *et al.* Therapeutic effect of Xanthohumol against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Veterinary microbiology**, v. 238, p. 108431, 2019.

LOU, S. *et al.* Inhibition of hepatitis C virus replication in vitro by xanthohumol, a natural product present in hops. **Planta medica**, v. 80, n. 02, p. 171-176, 2014.

LV, H. *et al.* Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 β -Nrf2 signal axis. **Redox biology**, v. 12, p. 311-324, 2017.

MACHADO JR, J. C. *et al.* Modeling of α -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. **Food chemistry**, v. 278, n.1, p. 216-222, 2019.

MAGALHÃES, P. J. *et al.* The impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: A pilot scale approach. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 246-256, 2008.

MAGALHÃES, P. J. *et al.* Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. **Natural product communications**, v. 4, n. 5, p. 193-200, 2009.

MAGALHÃES, P. J. *et al.* Influence of malt on the xanthohumol and isoxanthohumol behavior in pale and dark beers: A micro-scale approach. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 351-359, 2011.

MANACH, Claudine *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARTIN BIENDL, H. H. V. G.; MITTER, W. Use of a xanthohumol-rich hop product in beer production. 2011.

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

MARTINEZ-GOMEZ, A.o; CABALLERO, I.; BLANCO, C. A. Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. structure, reactivity and antioxidant activity. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 400, 2020.

MATHIAS, T. R. dos S; MELLO, P. P. M. de; SÉRVULO, E. F. C.. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal Brewing Distilling**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2014.

MIZOBUCHI, S.; SATO, Y. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. **Agricultural and biological chemistry**, v. 48, n. 11, p. 2771-2775, 1984.

MOIR, M. Hops - a millennium review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 58, n. 4, p. 131-146, 2000.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**, 4ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2009.

MUDURA, E.; COLDEA, T. Hop-derived prenylflavonoids and their importance in brewing technology: a review. **BUASVM Food Science and Technology**, v. 72, n. 1, p. 1-10, 2015.

MUÑOZ-GARCIA, N. *et al.* Moderate Beer Intake Downregulates Inflammasome Pathway Gene Expression in Human Macrophages. **Biology**, v. 10, n. 11, p. 1159, 2021.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, 2007.

OKUNJI, C. O. *et al.* An antifungal spirostanol saponin from fruit pulp of *Dracaena mannii*. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, n. 3, p. 193-199, 1990.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **J. Cleaner Prod.**, p. 1-21, 2012.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

ÖZCAN, M. M.; ALJUHAIMI, F.; USLU, N. Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 1, p. 226-232, 2018.

PALMER, J. J. **How to brew: Everything you need to know to brew great beer every time**. 1 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2017.

PASZKOT, J. Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 763, 2021.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 17, p. 4265-4275, 2012.

PRENCIPE, F. P. *et al.* Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, n.1, p. 50-59, 2014.

PULIDO, R.; HERNANDEZ-GARCIA, M.; SAURA-CALIXTO, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. **European journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 10, p. 1275-1282, 2003.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1231-1237, 1999.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. The chemistry of beer. **New Chemistry Magazine**, v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International journal of food microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotechnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Blucher, 2001.

SCHNAITTER, M. *et al.* Influence of hop harvest date of the 'Mandarina Bavaria' hop variety on the sensory evaluation of dry-hopped top-fermented beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 661-669, 2016.

SCHNEIDEROVÁ, K.; ŠMEJKAL, K. Phytochemical profile of *Paulownia tomentosa* (Thunb). Steud. **Phytochemistry reviews**, v. 14, n. 5, p. 799-833, 2015.

SILVA, G. A. da. **Melanoidinas de café e pães: importância na dieta brasileira e estudo da bioacessibilidade dos seus compostos fenólicos**. 2019.161f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1, p. 152-178, 1999.

SŁAWIŃSKA-BRYCH, A. *et al.* Xanthohumol inhibits the extracellular signal regulated kinase (ERK) signalling pathway and suppresses cell growth of lung adenocarcinoma cells. **Toxicology**, v. 357, n. 1, p. 65-73, 2016.

SOCHA, R. *et al.* Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. **International journal of food properties**, v. 20, n. sup1, p. S595-S609, 2017.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Health-related aspects of beer: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 2, p. 350-373, 2012.

SPENCER, J. P. E. *et al.* Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 12-22, 2008.

STEVENS, R. The chemistry of hop constituents. **Chemical Reviews**, v. 67, n. 1, p. 19-71, 1967.

STEVENS, J. F. *et al.* Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the α , β -unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. **Chemical research in toxicology**, v. 16, n. 10, p. 1277-1286, 2003.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004.

STEVENS, J. F.; TAYLOR, A. W.; DEINZER, M. L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 832, n. 1-2, p. 97-107, 1999.

TAGASGIRA, M.; WATANABE, M.; UEMITSU, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 740-742, 1995.

TOBOLA, D. *et al.* Xanthohumol content in Polish beers. **Przemysl Chemiczny**, v. 93, n. 8, p. 1447-1450, 2014.

VANDECAN, S. M. G. *et al.* Formação de sabor, cor e poder redutor durante o processo de produção de maltes especiais escuros. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, n. 3, p. 150-157, 2011.

VAN OPSTAELE, F. *et al.* Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets - Part 2: Preparation of single variety floral, citrus, and spicy hop oil essences by density programmed supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, n. 1, p. 147-161, 2012.

VERZELE, M. 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, n. 1, p. 32-48, 1986.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Blucher, 2010.

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. **Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2013.

VIEIRA, A. C. L. **Vicinal diketones monitoring during lager beer fermentation: the importance of nitrogenous compounds**. 2017. 130f. Tese de Doutorado. Universidade da Madeira, Funchal, 2017.

VIVIAN, Adriana Fu et al. Espectrometria de massa para a caracterização do processo cervejeiro. **Food Research International** , v. 89, p. 281-288, 2016.

VOLLMER, D. M.; ALGAZZALI, V.; SHELLHAMMER, T. H. Aroma Properties of Lager Beer Dry-Hopped with Oxidized Hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 1, p. 22-26, 2017.

VOGEL, S.; HEILMANN, J. Synthesis, cytotoxicity, and antioxidative activity of minor prenylated chalcones from *Humulus lupulus*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 7, p. 1237-1241, 2008.

WANG, Q. *et al.* Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. **Antiviral research**, v. 64, n. 3, p. 189-194, 2004.

WUNDERLICH, S.; ZÜRCHER, A.; BACK, W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 9, p. 874-881, 2005.

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.

YANG, M. *et al.* Xanthohumol, a main prenylated chalcone from hops, reduces liver damage and modulates oxidative reaction and apoptosis in hepatitis C virus infected *Tupaia belangeri*. **International immunopharmacology**, v. 16, n. 4, p. 466-474, 2013.

YOO, Y. B. *et al.* Xanthohumol inhibits cellular proliferation in a breast cancer cell line (MDA-MB231) through an intrinsic mitochondrial-dependent pathway. **Indian journal of cancer**, v. 51, n. 4, p. 518, 2014.

ZHANG, X.-L. *et al.* Evaluation on antioxidant effect of xanthohumol by different antioxidant capacity analytical methods. **Journal of Chemistry**, v. 2014, n. 1, p. 1-6, 20

ZHAO, H.; CHEN, W.; LU, J.; ZHAO, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chem**, n. 119 , p. 1150–1158, 2010.