

Análise da relação entre a caracterização química de cervejas e o conteúdo de alfa ácidos presente em dois cultivares de lúpulo

Analysis to study the relationship between the chemical characterization of beers and the content of alpha acids present in two cultivars of hops

Ana Luiza Arruda^{1*}(ORCID 0000-0001-9791-4850), Cristian Soldi²(ORCID 0000-0002-3326-8893), Evelyn Agostini¹(ORCID 0009-0007-8705-8473), Leo Rufato¹(ORCID 0000-0001-9545-7035), Daiana Petry Rufato¹(ORCID 0000-0003-0541-3253), Aike Anneliese Kretzschmar¹(ORCID 0000-0003-0890-8307)

¹Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil. *Autor para correspondência: analuiza1arruda@hotmail.com

²Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, SC, Brasil.

Submissão: 30/12/2022 | Aceite: 17/07/2023

RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta cuja inflorescência feminina é utilizada na indústria cervejeira para conferir amargor e aroma à bebida, sendo que, o Brasil importa cerca de 98% desta matéria-prima. Entretanto, essa planta vem ganhando destaque no país, influenciando diretamente as características de qualidade do produto final. Desta forma, o objetivo deste estudo foi explorar a relação entre o teor de alfa ácidos de dois cultivares de lúpulo produzidos no Brasil e nos Estados Unidos (primeiro no ranking em produção da cultura). O trabalho foi desenvolvido na Universidade de Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), em Lages/SC, no ano de 2021. Uma cerveja padrão do estilo *Indian Pale Ale* (IPA), com a mesma receita base, foi produzida. Cada tratamento consistiu na adição de diferentes cultivares de lúpulo (*Comet* e *Fuggle*) de duas origens (Brasil e Estados Unidos). Os resultados confirmaram que os cultivares e a origem do lúpulo influenciam as características químicas das cervejas avaliadas. A quantidade de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante da cerveja produzida com o cultivar *Fuggle* brasileiro foi 6,5% (850,09 meq ácido gálico L⁻¹); 75,5% (95,07 meq quercetina L⁻¹) e 13,8% (6890 mmol Trolox L⁻¹) superior, respectivamente, em relação à cerveja produzida com o mesmo cultivar originário dos Estados Unidos. Houve uma correlação negativa entre o teor de alfa ácidos e o conteúdo fenólico e capacidade antioxidante das cervejas. As cervejas em que foi utilizado lúpulo *Fuggle* brasileiro, com o menor teor de alfa ácidos dentre os avaliados, apresentaram maior associação positiva com o conteúdo de polifenóis totais, individuais e capacidade antioxidante das cervejas. Assim, as cervejas produzidas com o cultivar *Fuggle* Brasileiro apresentaram maior acúmulo de substâncias antioxidantes relacionadas com os indicadores de qualidade para o processamento e conservação da bebida.

PALAVRAS-CHAVE: cerveja artesanal; antioxidantes; *Humulus lupulus* L.; lúpulo brasileiro.

ABSTRACT

Hops (*Humulus lupulus* L.) is a plant whose female inflorescence is used in the brewing industry to impart bitterness and aroma to the drink, and Brazil imports about 98% of this raw material. However, this plant has been gaining prominence in the country, directly influencing the quality characteristics of the final product. Thus, the aim of this study was to explore the relationship between the alpha acids content of two hop cultivars produced in Brazil and the United States. The work was developed at UDESC/CAV, in Lages/SC, in the year 2021. A standard Indian Pale Ale beer, with the same base recipe, was produced. Each treatment consisted of the addition of different hop cultivars (*Comet* and *Fuggle*) from two origins (Brazilian and American). The results confirm that the cultivars and the origin of the hops influence the chemical characteristics of the evaluated beers. The amount of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of the beer produced with the Brazilian *Fuggle* cultivar was 6.5% (850.09 meq gallic acid L⁻¹); 75.5% (95.07 meq quercetin L⁻¹) and 13.8% (6890 mmol Trolox L⁻¹) higher, respectively, in relation to beer produced with the same cultivar originating in the United States. There was an inverse correlation between the alpha acid content and the phenolic content and antioxidant capacity of the beers. The beers in which Brazilian *Fuggle* hops were used, with the lowest alpha acid content among those adopted, showed a greater positive association with the total polyphenol content, individuals and antioxidant capacity of the beers. In conclusion, the beers produced with the cultivar *Fuggle* Brasileiro have a greater concentration of antioxidant substances.

KEYWORDS: craft beer; antioxidants; *Humulus lupulus* L.; brazilian hops.

INTRODUÇÃO

O lúpulo, planta trepadeira e perene, é utilizado desde os tempos antigos como medicina tradicional (LIU et al. 2015, KIM et al. 2016). Possui efeito positivo na cerveja, sendo que, essa matéria prima é utilizada não apenas para conferir amargor à bebida, mas também aroma e aumento na atividade antioxidante e antimicrobiana devido às propriedades organolépticas derivadas de ácidos orgânicos amargos, óleos essenciais, resinas e compostos polifenólicos (CERMAK et al. 2015). Essas características são conferidas pelas glândulas de lupulina que só podem ser secretadas pelos cones de plantas femininas de *Humulus lupulus* L. (NTOURTOGLOU et al. 2020).

Nos últimos anos, a cerveja tornou-se reconhecida como um produto altamente fenólico, sendo que a maioria dos polifenóis são derivados da cevada e cerca de 30% oriundos do lúpulo (QUIFER-RADA et al. 2015). Estudos têm mostrado a importância do teor de polifenóis na cerveja, levando ao reconhecimento desta bebida como apresentando benefícios à saúde semelhantes aos do vinho (ARRANZ et al. 2012). Como o lúpulo possui um conteúdo fenólico único, principalmente devido à presença de xantohumulol e outros flavonoides prenilados, a cerveja apresenta potencial para fornecer esses compostos específicos através da ingestão da bebida (ELROD et al. 2019)

O conteúdo fenólico na cerveja pode variar de acordo com o estilo, método de fabricação, cultivar de lúpulo, local de cultivo e condições climáticas durante o crescimento do lúpulo (KROFTA et al. 2008, GRANATO et al. 2011, ELROD et al. 2017). Cada cultivar de lúpulo apresenta um teor específico de alfa ácidos, que está associado à quantidade e ao tipo de compostos amargos contidos nas glândulas de lupulina, sendo que, uma maior quantidade de alfa ácidos indica um sabor mais amargo devido à presença de compostos como humulona, cohumulona e adhumulona (NICKERSON 1986). Como a cerveja é a principal fonte alimentar dos polifenóis presentes no lúpulo, uma maior compreensão do efeito de cada cultivar e origem do lúpulo na produção da bebida, ajudariam os consumidores interessados nos benefícios relacionados à ingestão de cerveja na escolha de cada produto.

Historicamente, o cultivo de lúpulo é mais habitual em países de clima temperado, sendo que atualmente o maior país produtor é os Estados Unidos, o qual possui aproximadamente 23 mil hectares de área plantada e produção anual de 49 mil toneladas (IHGC 2020). Em 2019 o Brasil importou praticamente 100% de todo lúpulo consumido, com um total de 3,2 mil toneladas de lúpulo, a um custo de aproximadamente U\$ 64 milhões (COMEX 2021). A recente escassez de lúpulo e o crescente apelo por cervejas especiais, unidos ao alto preço do lúpulo importado e ao sabor único conferido por cada cultivar, resultaram em um aumento do interesse na produção de lúpulo no Brasil (SIRRINE et al. 2010).

O cultivar de lúpulo Fuggle é muito adequado para realização do dry-hopping em cervejas estilo IPA, contribuindo com todas as características essenciais de sabor, aroma e amargor fornecendo equilíbrio para a bebida (HOPGUIDE 2022). O lúpulo Comet é um cultivar de duplo propósito, originado de um cruzamento do lúpulo Sunshine e uma variedade americana selvagem em 1961 na Universidade do Oregon, lançado pela primeira vez em 1974 (HOPGUIDE 2022).

De acordo com um levantamento sobre o panorama atual do cultivo de lúpulo no Brasil, o cultivar Comet está presente em 41 propriedades e o cultivar Fuggle em 21 propriedades de um total de 152 propriedades analisadas. Os números indicam que 27% dos estabelecimentos possuem o cultivar Comet e 14% possuem o cultivar Fuggle (KRETZER & CREUZ 2022).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi explorar a relação, por meio de análise multivariada, entre o teor de alfa ácidos de dois cultivares de lúpulo (Comet e Fuggle) proveniente de distintas origens (Brasil e Estados Unidos) nas características químicas das cervejas.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento da cerveja artesanal

As cervejas foram produzidas no Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV) em Lages/SC no ano de 2021. A bebida foi preparada de forma artesanal, com o auxílio de panelas automáticas em aço inox com capacidade total de 30 litros cada uma, em sistema Single Vessel, que possibilita a brassagem e a fervura do mosto em um único equipamento.

No total, foram produzidos 40 litros de cerveja através da mistura de 10 kg de malte *Pale* com 32 litros de água sob temperatura controlada de 67 °C. A mistura foi mantida em cozimento durante 60 minutos, e após, o mosto foi aquecido a 76 °C durante 10 minutos na etapa de *mash-out*. Em seguida, os grãos de malte foram separados do mosto líquido e foi realizado a lavagem dos grãos com 28 litros de água a 76 °C.

A fervura foi realizada separadamente, durante 60 minutos, de acordo com os tratamentos. O

esquema experimental foi bifatorial, considerando os cultivares e suas origens como fatores. Dessa forma, cada tratamento consistiu na junção de dois cultivares de lúpulo de duas diferentes origens. Na Tabela 1 podem ser observados os cultivares, origens e quantidades de lúpulo utilizados. As quantidades de lúpulo utilizadas durante o processo de fabricação da cerveja foram mantidas as mesmas para os tratamentos. Tais quantidades foram escolhidas com base no estudo de GOMES et al. (2022), o qual menciona que valores acima de 8 g L⁻¹ de lúpulo no *dry hopping* apresentam rendimentos decrescentes.

Tabela 1. Diferentes cervejas produzidas através da variação da origem do lúpulo “Comet” e “Fuggle”.
Table 1. Different beers produced by varying the origin of hops “Comet” and “Fuggle”.

Código da amostra	Cultivar	Origem	60 min	20 min	0 min
CoBra	Comet	Brasileiro	13,5 g	8 g	8 g
Colmp	Comet	Importado	13,5 g	8 g	8 g
FuBra	Fuggle	Brasileiro	13,5 g	8 g	8 g
Fuglmp	Fuggle	Importado	13,5 g	8 g	8 g

Em seguida, o mosto foi resfriado com um trocador de calor denominado *chiller* de imersão até atingir uma temperatura final de 24 °C. Cada tratamento foi colocado em um fermentador cônico de aço inox, totalizando 10 litros em cada um dos equipamentos, e foi colocado para fermentar em uma sala acondicionada a 18 °C durante sete dias, utilizando a levedura Fermentis US-05 em uma concentração de 0,6 g/L. Uma vez consumido todo o extrato fermentescível, iniciou-se o processo de maturação da cerveja, onde os fermentadores foram colocados em câmara fria com temperatura de 0 °C durante 15 dias.

Após finalizada a etapa de maturação, foi realizada uma adição extra de açúcares (6 g/L) com o objetivo de tornar a cerveja gaseificada. Posteriormente, as garrafas previamente sanitizadas foram cheias através da torneira do fermentador e fechadas com tampinhas de rolha metálica *pry-off*. As garrafas de cerveja foram colocadas em temperatura ambiente durante 14 dias para serem carbonatadas. Logo após, deu-se início a avaliação do produto.

Determinação dos alfa ácidos do lúpulo

Para a determinação dos alfa ácidos dos lúpulos foi utilizada a metodologia desenvolvida por HALEY et al. (2012). Uma amostra de 3 g de lúpulo seco foi obtida através da moagem do material com auxílio de um cadinho. Uma quantia de 2,5 g do lúpulo moído foi colocada em um béquer de 100 mL e adicionado 50 mL de metanol. Após, essa mistura foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A mistura foi então deixada em repouso por 10 min, para o material particulado assentar e em seguida foi realizada a filtragem em papel filtro qualitativo para remover o material particulado. Uma alíquota de 0,05 mL do filtrado foi colocado em um balão volumétrico de 25 mL e o frasco foi preenchido com NaOH (hidróxido de sódio) metanólico (0,5 mL de NaOH 6N em 250 mL de metanol). Uma parte desta solução foi então colocada em uma cubeta de quartzo e avaliada no espectrofotômetro no espectro UV-VIS (ultravioleta ao visível), usando de branco de 0,05 µL de metanol em 25 mL de NaOH metanólico. Foram obtidos os valores de absorvância para os três comprimentos de onda principais de 275, 325 e 355 nm. Três equações, com três incógnitas, foram usadas para descrever o sistema:

$$A_{355} = 31.8 C_{\alpha} + 46.0 C_{\beta} + 1.0 C_{\text{comp3}}$$

$$A_{325} = 38.1 C_{\alpha} + 33.1 C_{\beta} + 1.5 C_{\text{comp3}}$$

$$A_{275} = 9.0 C_{\alpha} + 3.7 C_{\beta} + 3.1 C_{\text{comp3}}$$

Que A_{355} , A_{325} e A_{275} são as absorvâncias nos três comprimentos de onda e C_{α} , C_{β} e C_{comp3} são as concentrações (em g/L) dos alfa ácidos, beta ácidos e o terceiro componente, respectivamente.

Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por SINGLETON & ROSSI (1965) com modificações realizadas por ZHAO et al. (2010). Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, a 0,5 mL da amostra de cerveja diluída (1:20), adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de Na₂CO₃ a 7,5%. O tubo de ensaio foi incubado por 5 min em Banho-Maria a 50 °C. Após 15 minutos de repouso, o complexo azul formado foi quantificado em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 760 nm. A medição foi então comparada com uma curva padrão de ácido gálico ($y=9,2867x + 0,0259 // R^2= 0,9972$) e o resultado expresso em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por litro de cerveja (mg GAE L⁻¹).

Flavonoides

Os flavonoides foram determinados de acordo com a metodologia proposta por MEDA et al. 2005,

com adaptações. A determinação foi realizada por espectrofotometria, com leitura realizada na faixa de absorvância de 415 nm. Em tubos de ensaio, colocou-se 2 mL da amostra diluída (1:1) e acrescentou-se 2 mL de cloreto de alumínio à 2% em metanol. Após 30 minutos de repouso, as leituras foram realizadas. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração ($y = 14,765x + 0,0488$ // $R^2 = 0,9983$) usando o padrão quercetina e os resultados foram expressos em mg de quercetina (QE) por litro de cerveja (mg QE L^{-1}).

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das cervejas foi determinada pela metodologia baseada na determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (RUFINO et al. 2006). O reagente FRAP foi preparado no dia da análise e utilizado imediatamente, através da mistura de 25 mL do tampão de acetato (0,3 M), 2,5 mL da solução TPTZ (2,4,6-Tris(2-Piridil)-S-Triazina) (10 mM) e 2,5 mL de uma solução de cloreto de ferro (20 mM).

Para tubos de ensaio foi transferida uma alíquota de 0,09 mL da bebida, 2,7 mL do reagente FRAP e 2,7 L de água destilada. A mistura foi homogeneizada e os tubos mantidos em banho maria à 37 °C durante 30 minutos. Após, a absorvância foi quantificada no comprimento de onda de 595 nm, onde foi utilizado o reagente FRAP para calibração do espectrofotômetro. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão Trolox e os resultados foram expressos em mg de Trolox por litro de cerveja (mg Trolox L^{-1}).

Amargor

A análise dos níveis de amargor nas cervejas foi realizada de acordo com a Analytica EBC 2010. Uma amostra de cerveja desgaseificada (10 mL) foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, adicionou-se uma solução de HCl (ácido clorídrico) 6 N (0,5 mL) e isooctano (20 mL) e as amostras foram agitadas por 30 minutos. Logo após, a amostra foi centrifugada em recipientes Falcon (5 minutos, 3000 rpm). Em seguida, uma amostra foi retirada da camada de isooctano e determinada com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 275 nm. O isooctano puro foi a amostra de referência. O amargor foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{IBU} = 50 \cdot A$ (IBU—unidades de amargor; A—absorvância a 275 nm).

Compostos Fenólicos Individuais

As amostras de cerveja foram analisadas quanto à composição fenólica usando um equipamento de HPLC (cromatógrafo líquido de alta eficiência) (Agilent 1260, Agilent Technologies) acoplado a uma coluna de fase reversa (HPLC Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 μm) e Diode-Array Detector. As amostras foram filtradas (0,45 μm , filtros de seringa de nylon, 15 mm, tecnologias Agilent, Alemanha) antes da injeção. O sistema solvente foi baseado em 0,2% de ácido acético em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) e 0,2% de ácido acético em metanol puro (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase A e B, respectivamente. Para a separação cromatográfica foi utilizado 1% de B por dois min, depois de 1 a 20% em quatro min e de 20 a 30% em quatro min, que foi mantido em 30% por cinco min. Em seguida, o solvente foi trocado de 30 para 50% em cinco minutos e mantido por mais cinco minutos. Um gradiente de 50 a 100% de B foi estabelecido em cinco min com cinco min de espera.

Então, o solvente B voltou a 1% em dois min com três min de espera antes da próxima injeção. O tempo total de análise foi de 40 minutos. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL min^{-1} , o volume de injeção foi de 5 μL e o compartimento da coluna foi de 30 °C. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração de cada padrão. O método HPLC foi validado determinando a linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O limite de detecção foi determinado pelo método da relação sinal-ruído.

Condições de extração no HS-SPME

Para a extração dos componentes voláteis das amostras foi utilizada metodologia já otimizada, previamente descrita por ALVES et al. (2020). Em um vial de 15 mL contendo uma barra de agitação magnética e 0,7500 \pm 0,005 g de NaCl foi adicionado 7,5 mL de amostra e 20 μL de solução de 4-metil-2-pentanol (1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O vial foi inserido em um recipiente contendo uma jaqueta de vidro o qual estava sobre uma chapa de agitação magnética e conectado a um banho termostatizado com circulação de água (SOLAB SL 152, Piracicaba, SP, Brasil). O vial foi mantido em banho de água à 40 \pm 0,2 °C e o conteúdo foi mantido sob agitação por cinco minutos. A fibra de SPME (microextração em fase sólida) foi exposta ao headspace do vial o qual foi mantido nessa mesma temperatura por 30 minutos. Foi utilizada fibra de SPME composta por divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com cobertura de 50/30 μm de espessura e 1 cm de comprimento (marca do equipamento SUPELCO, Bellefonte, PA, USA).

Condições do GCMS

A fibra de SPME contendo os componentes voláteis adsorvidos foi manualmente inserida no injetor do GCMS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) à 250 °C (modo *splitless*; equipado com *liner* de vidro, 0,75 mm) e mantido por cinco minutos. Os componentes desorvidos foram separados em um Agilent 7890A GCMS usando metodologia adaptada de BENUCCI et al. (2021). Uma coluna Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) composta por 95% dimetil/5% diphenil polissiloxano foi utilizada com fluxo de gás Hélio de 1,0 ml min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida à 40 °C por cinco min seguida de rampa de aquecimento de 40 a 260 °C com taxa de aquecimento de 9 °C min⁻¹. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram configuradas a 300 °C.

Os dados foram adquiridos no modo Full Scan com faixa de 30 – 400 m/z (razão na abscissa). O espectrômetro de massas foi operado com impacto de elétrons a 70 eV. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os picos foram integrados manualmente em software G1701EA GC/MSD Chemstation. As substâncias voláteis foram caracterizadas através da comparação do espectro de massas e do índice de Kovats (KI) experimental para cada componente com os respectivos espectros de massas e índices de Kovats de padrões descritos por ADAMS (2007). Os valores de KI experimentais foram obtidos a partir da injeção de uma amostra de hidrocarbonetos saturados C7-C30 (Sigma-Aldrich) nas mesmas condições utilizadas para as amostras e calculados de acordo com VAN DEN DOOL & KRATZ (1963).

Análise dos Dados

Os dados coletados foram submetidos inicialmente ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos da análise de variância (ANOVA). Na sequência foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade entre as variâncias. Atendidos esses dois pressupostos os dados referentes ao percentual de alfa ácidos do lúpulo foram submetidos à ANOVA (análise de variância) e quando significativos pelo teste F foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Para avaliar a inter-relação entre as variáveis analisadas e explicar as diferenças entre os tratamentos como um todo, foi utilizada a Análise de Componentes Principais. Com a Análise de Componentes Principais torna-se mais simples identificar quais fatores influenciam de maneira significativa na diferença entre os tratamentos. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa R com a utilização dos seguintes pacotes: ExpDes.pt, Readxl e Factoshiny (R CORE TEAM 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, as quais explicam 97,0% do total de informações do modelo. Como a primeira componente principal foi responsável por explicar 90,1% da variação dos tratamentos, apenas esta componente já é suficiente para interpretação do efeito das variáveis estudadas nos tratamentos.

De acordo com a dimensão 1, fica evidente a separação das cervejas dependendo do cultivar utilizado no processo de produção, com Fuggle à direita e Comet à esquerda do gráfico. Tanto o cultivar Fuggle brasileiro quanto o importado ficaram posicionados no lado direito do gráfico, numa direção resultante do somatório dos vetores associados às variáveis Atividade Antioxidante, Flavonóides e Compostos Fenólicos, bem como inversamente aos vetores das variáveis Alfa Ácidos e Amargor. Esse posicionamento possibilita inferir que este cultivar, independente da origem, teve maiores quantidades de Atividade Antioxidante, Flavonóides e Compostos Fenólicos e menores quantidades de Alfa Ácidos e Amargor que o cultivar Comet, bem como o oposto também é verdadeiro. Entre as origens do cultivar Fuggle, o importado (Grupo II) resultou em menores quantidades de Atividade Antioxidante, Flavonóides e Compostos Fenólicos e maiores quantidades de Alfa Ácidos e Amargor que o brasileiro.

Os tratamentos do Grupo III, compostos pelo cultivar Comet em ambas as origens, destacaram-se pelas maiores quantidades de alfa ácidos. A diferença entre as origens ficou relacionada ao amargor, com o Comet brasileiro resultando em maior amargor que o importado.

De acordo com o teste F, as concentrações de alfa ácidos dos lúpulos apresentaram interação significativa entre os fatores estudados. O resumo da análise de variância Tabela 2.

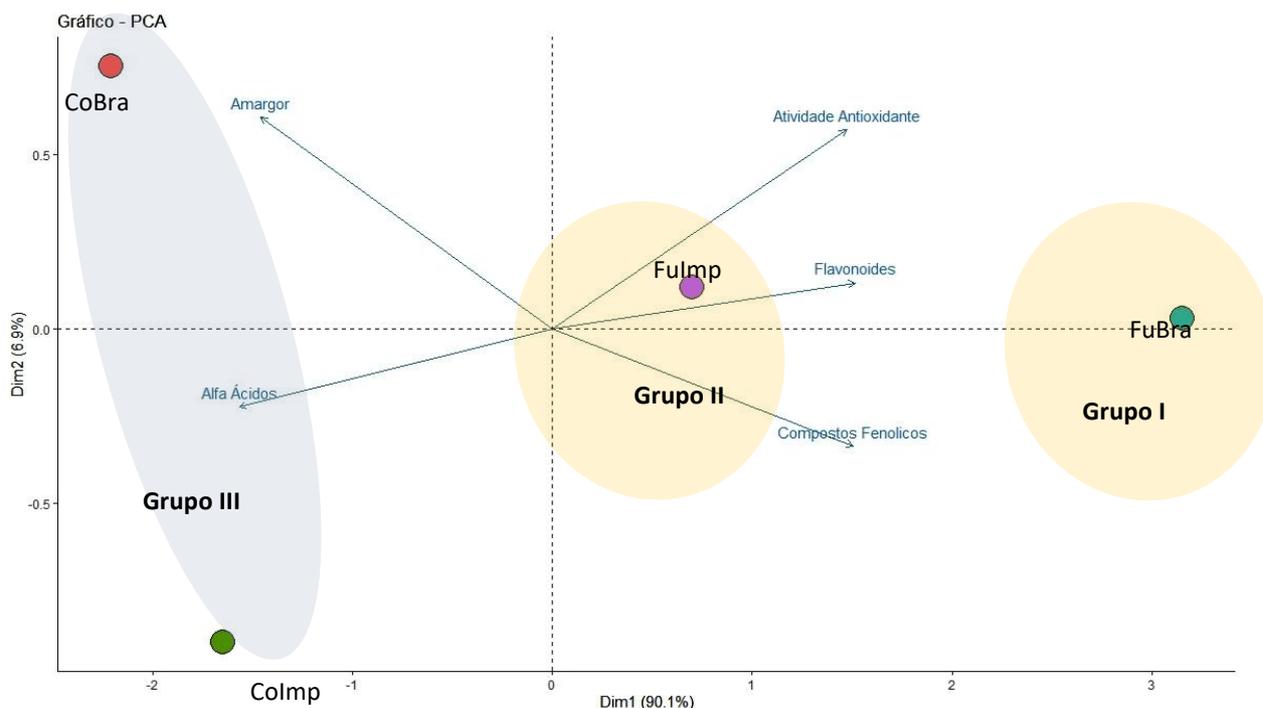


Figura 1. Análise de componentes principais para as variáveis: amargor; atividade antioxidante; flavonoides e compostos fenólicos totais utilizando lúpulo “Comet” ou “Fuggle” importado ou brasileiro na produção de cervejas. CoBra = Comet Brasileiro; Colmp = Comet Importado; FuBra = Fuggle Brasileiro; Fulmp = Fuggle Importado.

Figure 1. Principal component analysis for the variables: bitterness; antioxidant activity; flavonoids and total phenolic compounds using “Comet” or “Fuggle” imported or Brazilian hops in the production of beers. CoBra = Brazilian Comet; Colmp = Comet Imported; FuBra = Brazilian Fuggle; Fulmp = Imported Fuggle.

Tabela 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação nos dados de percentual de alfa ácidos de dois cultivares de lúpulo (Comet e Fuggle) e origens do material (Brasil e Estados Unidos).

Table 2. Summary of analysis of variance (ANOVA) for variation factors in alpha acid percentage data from two hop cultivars (Comet and Fuggle) and material origins (Brazil and United States).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	p-valor
Cultivar	1	182,26	4	0,00000001*
Origem	1	16,97	3	0,00005337*
Cultivar x Origem	1	9,77	5	0,00036004*
Resíduo	8	2,24	2	
Total	11	211,24	1	
CV (%)		6,39		

*Diferença significativa pelo teste F à 5% de significância.

As maiores concentrações dessa variável foram identificadas no cultivar Comet independente da origem estudada. Por outro lado, o cultivar Fuggle cultivado no Brasil apresentou os menores valores de alfa ácidos (Tabela 3).

Ainda de acordo com a análise de componentes principais da Figura 1, é possível observar uma correlação negativa entre o conteúdo de alfa ácidos dos cultivares com as variáveis compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e flavonoides (Figura 1). As cervejas em que os lúpulos com menores percentuais de alfa ácidos foram utilizados apresentaram maiores valores de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e flavonoides. O resultado está de acordo com o encontrado por ELROD et al. (2019) que ao analisar a relação entre o teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e o conteúdo de alfa ácidos do lúpulo verificaram que os cultivares com menores valores de alfa ácidos apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante.

Tabela 3. Quantidade de alfa ácidos em cada cultivar e origem de lúpulo determinados por Rev. Ciênc. Agrovet., Lages, SC, Brasil (ISSN 2238-1171)

espectrofotometria.

Table 3. Amount of alpha-acids in each cultivar and hop origin determined by spectrophotometry.

Cultivar	Origem	
	Brasil	Estados Unidos
Comet	11,89 Aa	12,46 Aa
Fuggle	2,29 Bb	6,47 Ba
CV (%)	6,39	

*Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância.

Em contrapartida, há uma correlação positiva entre o teor de alfa ácidos com o amargor das cervejas. O amargor é um indicador de ácidos em solução e essas características indicam um aumento no número de prótons livres. Portanto, menores teores de alfa ácidos possuem maior potencial antioxidante, visto que, apresentam menos cargas livres em solução (ELROD et al. 2019). Com base nisso, sugere-se que determinados cultivares de lúpulo podem ser mais benéficos do que outros na produção das cervejas visando maiores concentrações de polifenóis e atividade antioxidante.

Os maiores valores de amargor encontrados nas cervejas produzidas com o cultivar Comet, independente da origem (Grupo III) estão relacionados com a quantificação da maior quantidade de alfa ácidos (Tabela 3), os quais conferem à bebida o amargor necessário (MIKYŠKA & KROFTA 2012). A quantidade de alfa ácidos presente no cultivar Fuggle Brasileiro (2,47%) está abaixo do mínimo para a variedade (HORNOR et al. 1972). Esse valor não impede o seu uso, apenas será necessário utilizar uma quantidade de lúpulo superior para fornecer amargor para a cerveja.

A Tabela 4 mostra as características para os 18 compostos identificados na cerveja via cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados confirmam um excelente coeficiente de determinação para todos os compostos.

Tabela 4. Comprimento de onda, tempo de retenção, equação da reta, R², limite de detecção e limite de quantificação para os 18 compostos identificados na cerveja produzida com diferentes cultivares de lúpulo (Fuggle e Comet) provenientes de diferentes locais de cultivo (importado e brasileiro).

Table 4. Wavelength, retention time, straight line equation, R², limit of detection and limit of quantification for the 18 compounds identified in beer produced with different hop cultivars (Fuggle and Comet) from different cultivation sites (imported is Brazilian).

Composto	λ (nm)	TR (min)	Equação da reta	R ²	LOD mg/L	LOQ (mg/L)
Ácido Gálico	255	5,9790	y = 1550159,55x + 627914,51	0,9980	0,0007	0,00669
Galocatequina	255	8,1300	y = 162492x + 72412	0,9962	0,0123	0,12275
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	255	8,5670	y = 2402217,95 + 1081177,78	0,9993	0,0004	0,00384
2-(4-hidroxifenil) etanol	280	10,6010	y = 901595x + 392289	0,9979	0,0016	0,01618
Ácido Vanílico	255	12,4710	y = 2825268,59x - 974532,62	0,9838	0,0004	0,00420
Ácido Cafeico	320	12,7050	y = 4825927,96x + 1960324,51	0,9973	0,0002	0,00207
Epicatequina	280	13,0580	y = 519655x + 165455	0,9930	0,0018	0,01789
Ácido Siríngico	280	13,2570	y = 2492983,64x + 1527153,91	0,9917	0,0012	0,01180
Ácido p-cumarico	320	16,1670	y = 6205117,62x + 2151677,30	0,9996	0,0003	0,00323
Ácido Sinapínico	320	17,7880	y = 4568685,97x + 1072369	0,9982	0,0003	0,00252
Ácido Ferúlico	320	18,3100	y = 4154370,57x + 1614583,50	0,9990	0,0002	0,00224
Miricitrina	360	20,7870	y = 1389801,21x + 570183,28	0,9983	0,0005	0,00511
Rutina	360	21,5800	y = 1418048,15x + 590214,45	0,9986	0,0010	0,01028
Ácido Elágico	255	22,1600	y = 2723406,12x + 634171,48	0,9990	0,0004	0,00390
Miricetina	360	22,6510	y = 2159130,63x + 516689,02	0,9983	0,0007	0,00701
Quercetina	280	24,6730	y = 6576666,49x + 1853766,32	0,9993	0,0002	0,00225
Ácido Cinâmico	360	25,6080	y = 2519950,60x + 892064,18	0,9988	0,0006	0,00552
Kaempferol	360	28,9990	y = 2437818,15x + 977632,71	0,9990	0,0013	0,01288

Para a análise de componentes principais dos compostos fenólicos individuais, foram escolhidas duas

componentes, com base em uma variância acumulada de 85,3%. A análise foi construída com os compostos mais relevantes para determinar as diferenças entre os cultivares (Comet e Fuggle) e origens (brasileiro e importado) do lúpulo.

A Figura 2 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, que explicam 85,3% do total de informações do modelo, sendo 53,1 % explicada pela primeira componente e 32,2% explicada pela segunda componente.

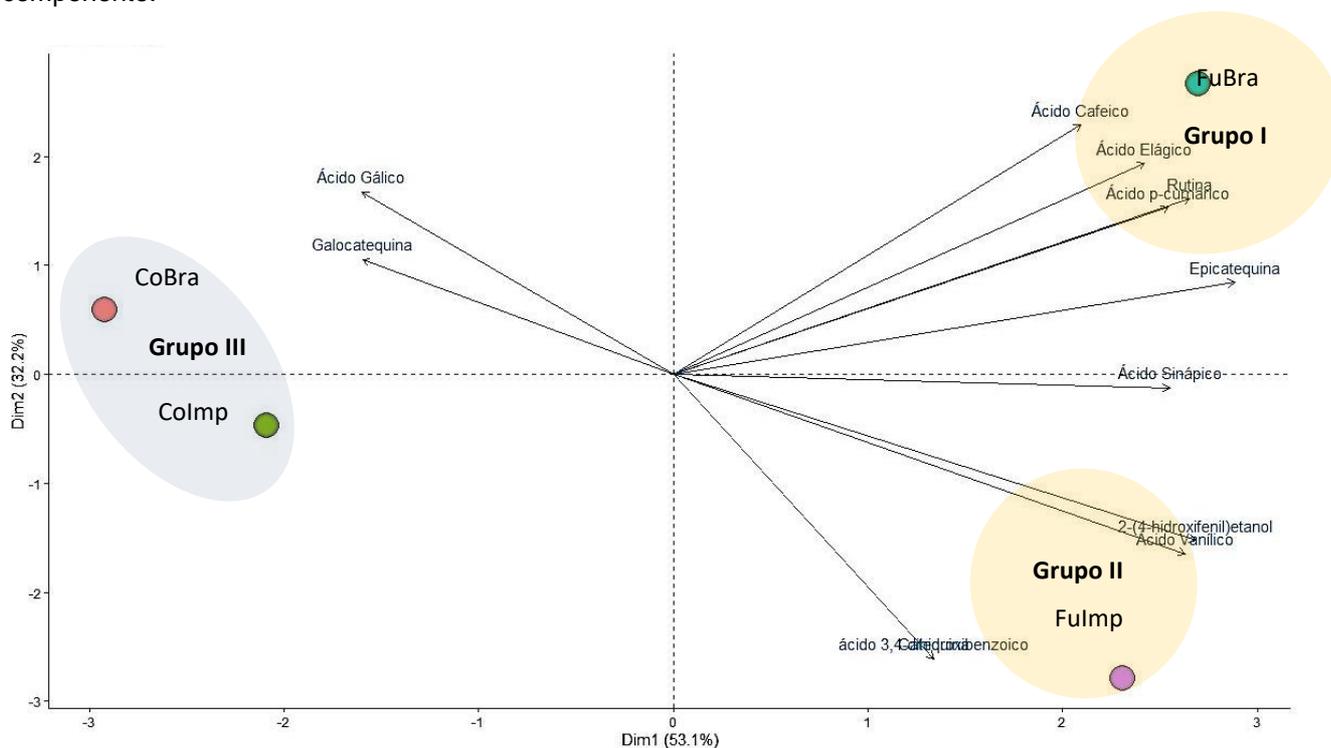


Figura 2. Análise dos componentes principais para os compostos fenólicos individuais caracterizados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cervejas produzidas com os lúpulos “Comet” e “Fuggle” importado ou brasileiro. CoBra = Comet Brasileiro; Colmp = Comet Importado; FuBra = Fuggle Brasileiro; Fulmp = Fuggle Importado.

Figure 2. Principal component analysis for individual phenolic compounds characterized via high performance liquid chromatography (HPLC) in beers brewed with imported or Brazilian “Comet” and “Fuggle” hops. CoBra = Brazilian Comet; Colmp = Comet Imported; FuBra = Brazilian Fuggle; Fulmp = Imported Fuggle.

Considerando os resultados apresentados na Tabela 5, nota-se que as cervejas produzidas com o lúpulo brasileiro apresentaram concentração fenólica total mais elevada (soma das concentrações fenólicas individuais de cada composto).

Em geral, a composição e a concentração fenólica das amostras de cerveja apresentaram uma variação conforme a origem do lúpulo. O composto fenólico catequina apresentou concentrações mais altas em todas as amostras analisadas, se comparado com os demais compostos, com concentração de até 152,05 mg L⁻¹. O resultado está de acordo com SILVA et al. (2021), que ao analisar a presença de compostos fenólicos em cervejas brasileiras encontraram a catequina com componente majoritário. A catequina é um composto de grande importância, e por ser capaz de quelar radicais livres e inibir a enzima lipoxigenase, que promovem o início da ruptura dos ácidos graxos insaturados, quando liberadas através da polimerização, pode formar novos compostos fenólicos, apresentando de maneira efetiva ação como antioxidantes no organismo (SIQUEIRA et al. 2008). Além disso, esse composto prolonga a vida útil da cerveja devido as suas propriedades antissépticas (ALONSO-ESTEBAN et al. 2019).

O ácido vanílico e o ácido elágico estiveram presentes nas cervejas produzidas com o lúpulo *Fuggle* em ambas as origens e esses compostos não foram verificados nas cervejas produzidas com o lúpulo *Comet* brasileiro ou importado, indicando que há uma composição diferenciada para cada cultivar de lúpulo utilizado. O ácido cafeico e o ácido p-cumárico foram observados apenas nas cervejas produzidas com o lúpulo *Fuggle* brasileiro.

locais de origem.

Table 5. Concentration (mg L^{-1}) of phenolic compounds in beers produced with different cultivars and places of origin

Compostos Fenólicos	Concentração (mg L^{-1})			
	Fuggle Importado	Fuggle Brasileiro	Comet Importado	Comet Brasileiro
Ácido Gálico	1,68	2,23	1,82	3,00
Galocatequina	10,73	14,61	9,10	30,75
Catequina	152,05	89,36	91,30	99,26
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0,60	0,17	0,18	0,24
2-(4-hidroxifenil)etanol	10,61	5,78	2,04	1,01
Ácido Vanílico	0,182	0,016	<LOD	<LOD
Ácido Cafeico	<LOD	0,10	<LOD	<LOD
Epicatequina	0,80	1,33	0,37	<LOD
Ácido Siríngico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido p-cumárico	<LOD	0,07	<LOD	<LOD
Ácido Sinápico	0,49	0,45	0,07	0,28
Ácido Ferúlico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Miricitrina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rutina	6,32	15,96	1,40	0,84
Ácido Elágico	0,58	2,75	<LOD	<LOD
Miricetina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Quercetina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Cinâmico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Total (soma dos compostos fenólicos)	31,99	43,47	14,98	36,12

A presença dos compostos ácido siríngico, ácido ferúlico, miricitrina, miricetina, quercetina, ácido cinâmico e kaempferol não foi observada em nenhum dos tratamentos analisados.

Na Figura 3, estão demonstrados os cromatogramas referentes aos compostos fenólicos individuais identificados no comprimento de onda 255 nm em amostras de cerveja produzidas com diferentes cultivares de lúpulo provenientes de dois locais distintos.

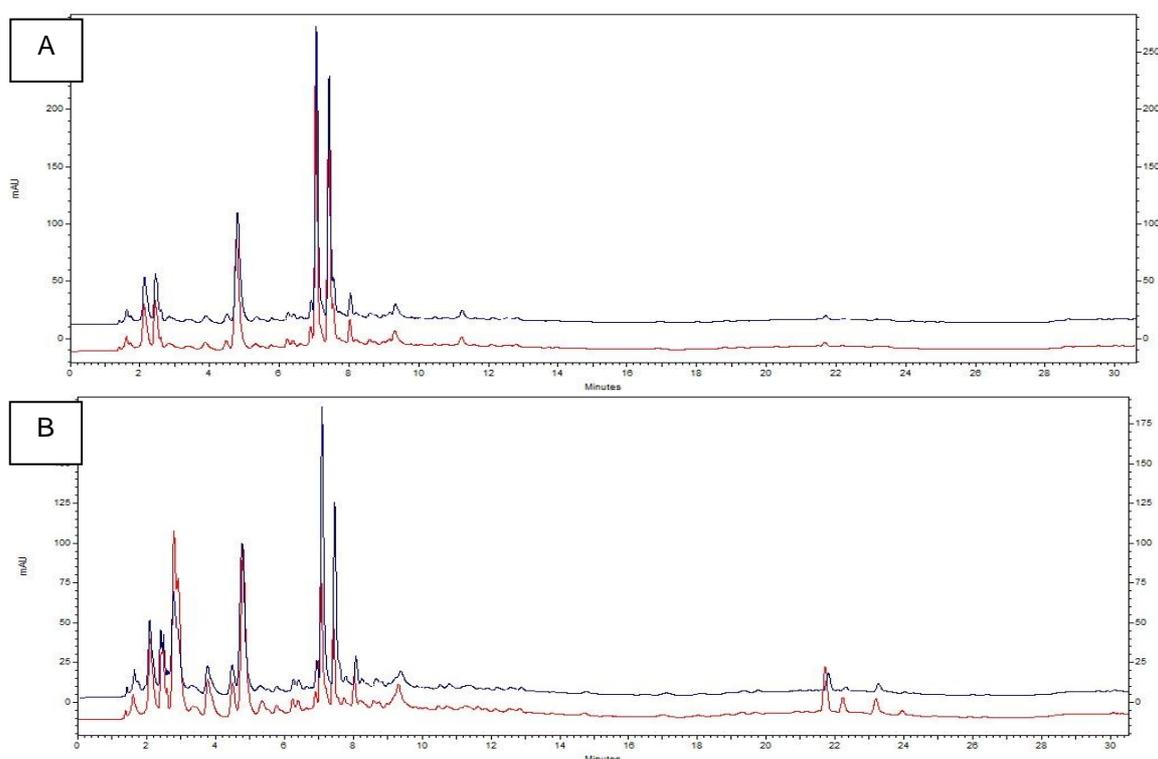


Figura 3. Cromatograma obtido por HPLC para os tratamentos: Comet Importado (A – azul); Comet Brasileiro (A- vermelho); Fuggle Importado (B- azul); Fuggle Brasileiro (B – vermelho) no comprimento de onda 255 nm.

Figure 3. Chromatogram obtained by HPLC for the treatments: Imported Comet (A – blue); Comet Brazilian (A-red); Imported Fuggle (B-blue); Brazilian Fuggle (B – red) at wavelength 255 nm.

Existe uma correlação negativa entre o conteúdo de alfa ácidos dos cultivares com os compostos fenólicos individuais. Com exceção da galocatequina, as cervejas em que os lúpulos com menores percentuais de alfa ácidos foram utilizados apresentaram maiores valores de compostos fenólicos individuais. O resultado está de acordo com o encontrado com a análise de compostos fenólicos totais, em que as cervejas produzidas com os cultivares que apresentaram menores valores de alfa ácidos deram origem a bebidas com maior teor de compostos fenólicos totais.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados indicam que quanto menor o teor de alfa ácidos do lúpulo (Fuggle Brasileiro) maior será a concentração fenólica e antioxidante da cerveja.

Cada estilo de cerveja pode variar na quantidade de compostos bioativos com base na seleção do lúpulo.

As cervejas produzidas com o cultivar Fuggle Brasileiro contém maior teor de substâncias antioxidantes quais auxiliam na manutenção das características sensoriais do produto final, sendo também, importantes para a saúde.

REFERÊNCIAS

- ADAMS RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 800 p.
- ALONSO-ESTEBAN JI et al. 2019. Phenolic Composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) seeds. *Industrial Crops and Products* 134: 154–159.
- ALVES V et al. 2020. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chemistry* 326: 1-10.
- ARRANZ S et al. 2012. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients* 4: 759-781.
- BENUCCI I et al. 2021. Novel microencapsulated yeast for the primary fermentation of green beer: kinetic behavior, volatiles and sensory profile. *Food Chemistry* 340: 1-11.
- CERMAK P et al. 2015. Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33: 302-307.
- COMEX. 2021. Portal do comércio exterior do Brasil. Exportação e Importação geral. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acesso em: 4 abr. 2021.
- EBC. 2010. EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analytica-EBC. Germany: Nürnberg.
- ELROD SM et al. 2017. High Phenolic Beer Inhibits Protein Glycation in Vitro. *J. Am. Soc. Brew. Chem* 75: 1–5.
- ELROD SM et al. 2019. Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77: 134-139.
- GOMES FO et al. 2022. Advances in dry hopping for industrial brewing: a review. *Food Science and Technology* 42: 1-8.
- GRANATO D et al. 2011. Characterization of Brazilian Lager and Brown Ale Beers Based on Color, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity Using Chemometrics. *J. Sci. Food Agric* 91: 563–571.
- HALEY E et al. 2012. A Multicomponent UV Analysis of α - and β -Acids in Hops. *Journal of Chemical Education* 89: 117–120.
- HOPGUIDE. 2022. Disponível em: [file:///C:/Users/Margarete/Downloads/Hop_EN%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Margarete/Downloads/Hop_EN%20(1).pdf). Acesso em: 05 fev.2023
- HORNER CE et al. 1972. Registration of Fuggle H Hop. *Crop Science* 12: 1714.
- IHGC. 2020. IHB-Sortenliste. Hopfen-Rundschau. Disponível em: <https://www.deutscher-hopfen.de/downloads/IHB-Sortenliste%202020.pdf>. Acesso em: 10 ma. 2020.
- KIM D et al. 2016. Phenols displaying tyrosinase inhibition from *Humulus lupulus*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31: 742-747.
- KRETZER SG & CREUZ A. 2022. Lúpulo no Brasil: Perspectivas e realidades. In: Diagnóstico da situação atual do cultivo de lúpulo no Brasil. Brasília: MAPA. p. 12-49.
- KROFTA K et al. 2008. Antioxidant characteristics of hops and hop products. *Journal of the Institute of Brewing*, 114: 160–166.
- LIU M et al. 2015. Pharmacological profile of xanthohumol a prenylated flavonoid from hops (*H. lupulus*). *Molecules* 20: 754-779.
- MEDA A et al. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
- MIKYŠKA A & KROFTA K. 2012. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. *Journal of the Institute of Brewing* 118: 269–279.
- NICKERSON GB. 1986. Varietal Differences in the Proportions of Cohumulone, Adhumulone, and Humulone in Hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem* 44: 91–94.
- NTOURTOGLOU G et al. 2020. Pulsed electric field extraction of α and β -acids 137 from pellets of *Humulus lupulus* (Hop). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 1-12.

- QUIFER-RADA P et al. 2015. A Comprehensive Characterisation of Beer Polyphenols by High Resolution Mass Spectrometry (LC–ESI-LTQ-OrbitrapMS). *Food Chemistry* 169: 336-343.
- R CORE TEAM. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna: Austria.
- RUFINO MSM et al. 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa. 4p.
- SILVA MC et al. 2021. A Simple Method for Evaluating the Bioactive Phenolic Compounds' Presence in Brazilian Craft Beers. *Molecules* 26: 1-16
- SINGLETON VL & ROSSI J. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158.
- SIQUEIRA PB et al. 2008. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimento e Nutrição* 19: 491-498
- SIRRINE R et al. 2010. Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region. *Extension Bulletin*, 3083: 1-12.
- VAN DEN DOOL H & KRATZ P. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11: 463–471.
- ZHAO H et al. 2010. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* 119: 1150–1158.