



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM CERVEJA ARTESANAL ESTILO RED ALE COM ADIÇÃO DE ESPECIARIAS

Roberto Campos Nunes Neto ⁽¹⁾

Wilma Aparecida Spinosa ⁽²⁾

Marta de Toledo Benassi ⁽²⁾

Resumo

Os polifenóis contidos nas cervejas são provenientes dos insumos utilizados na fabricação da bebida e são os responsáveis pela estabilidade coloidal e do sabor. Esses compostos podem agir como antioxidantes na bebida e seqüestrar radicais livres, atuar como quelante de metais de transição, influenciar a ação enzimática e ter importância direta tanto na bebida jovem como também na envelhecida em garrafa. O presente trabalho propôs a analisar, cervejas puro malte estilo *Red Ale* com adição das especiarias, açafraão da terra (*Cúrcuma longa*) e a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), por terem características sensoriais exclusivas e comprovada atividade antioxidante. Pretendeu-se, com isso, avaliar os compostos bioativos na bebida. A proposta foi utilizar planejamento de mistura do tipo *simplex centróide* para comparar às cervejas com o uso de especiarias. Estas foram adicionadas na etapa de maturação na forma de extrato, a cúrcuma foi acrescentada na proporção de 1 g/L; já a pimenta-do-reino, na concentração de 1,5 g/L de mosto. Para comparação, o lúpulo foi adicionado ao final da fervura e na maturação, totalizando concentração de 5 g/L. No planejamento também foram avaliadas as combinações de *blends* das especiarias, as misturas binárias e terciária para as mesmas. Após a maturação, as cervejas foram acondicionadas em garrafas de vidro para nova fermentação. Para a análise de compostos fenólicos foi empregado espectrofotometria, utilizando o reagente Folin – Ciocalteu com padrão de ácido gálico. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos espectrofotométricos DPPH e FRAP, utilizando como padrão o reagente Trolox.

Palavras-chave: Açafraão-da-terra; Pimenta-do-reino; Lúpulo, Malte de Cevada.

1 Introdução

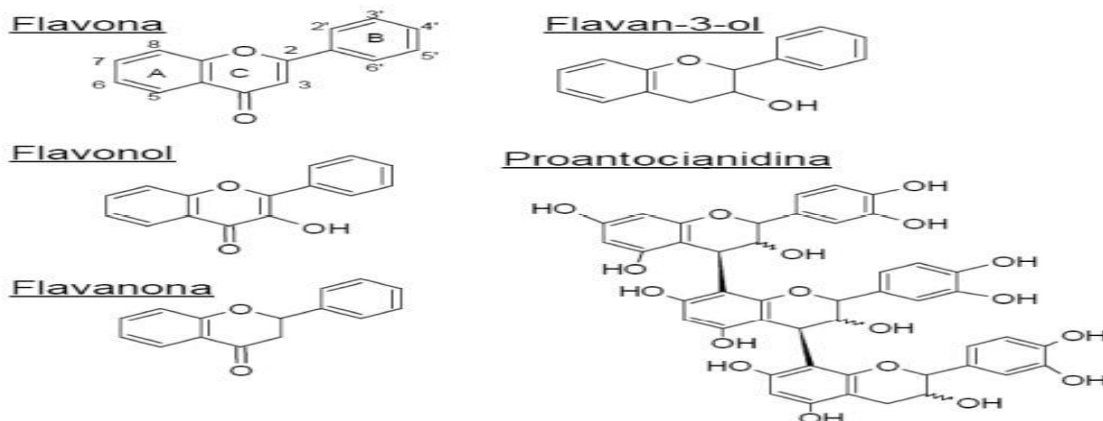
Pesquisas têm demonstrado que o consumo moderado de cerveja pode ser parte de um estilo de vida saudável de um adulto. No entanto, é importante enfatizar que os efeitos benéficos são conferidos apenas ao consumo moderado que pode acarretar em uma vida longa e saudável do que quando ingerida de forma abusiva ou a abstenção da ingestão do álcool. Abusar da bebida pode ser prejudicial e está associado a muitos problemas de saúde crônicos como câncer e hipertensão (BAMFORTH, 2004; SIERKSMA & KOK, 2012).

Tanto no malte de cevada como no lúpulo, insumos básicos para a fabricação de cerveja, os compostos fenólicos representam um grupo químico de substâncias caracterizadas pela presença de pelo menos uma unidade de fenol. Classificadas pelo tipo e número de compostos fenólicos subcomponentes presentes, os polifenóis (figura 1) são geralmente divididos em categorias como os taninos hidrolisáveis, do flavonóide elagitaninos ou fenilpropanoides: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis e proantocianidinas (ARON e SHELLHAMMER, 2010).

Figura 1 estrutura de alguns flavonóides fenólicos

¹ Mestrando em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina - UEL

² Docente em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina - UEL



Segundo Dvořáková et al (2008), os compostos fenólicos, presentes em todas as plantas, são de grande importância para alimentos e bebidas derivadas de plantas, uma vez que estes compostos são responsáveis por suas propriedades sensoriais. Como consequência, eles estão intimamente relacionados com a qualidade desses produtos, e assim a sua análise é de considerável interesse. Além disso, nos últimos anos, numerosos estudos de investigação associaram o consumo de alimentos ricos em polifenóis com a prevenção de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e outras doenças relacionadas com o envelhecimento, graças às suas propriedades antioxidantes.

Além dessa propriedade benéfica, parte desses compostos está associada à estabilidade coloidal e de sabor da bebida devido ao fato de atuarem como antioxidantes assim preservando as qualidades sensoriais da bebida quando submetida à prateleira (Cao et al., 2011)

Com os relatos sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana da cúrcuma e da pimenta-do-reino e não existir em literatura o uso desses em cervejas o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antioxidante e a quantidade de fenólicos em cervejas do estilo Red Ale com adição de especiarias, entre elas o açafrão-da-terra (*Cúrcuma longa*) e a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) por terem características exclusivas e comparar com o uso de técnicas de lupulagem para aroma.

2 Material e Métodos

2.1 Preparo da bebida

A bebida foi desenvolvida de acordo com o trabalho desenvolvimento e caracterização físico-química em cerveja artesanal estilo *red ale* com adição de especiarias (NUNES-FILHO et al, 2016).

2.2 Planejamentos e análise estatística

Foi realizado planejamento de mistura *simplex centróide* do tipo cúbico especial e com repetição no ponto central, e as análises de variância (ANOVA) foram processadas no programa computacional Statistica versão 8.0 (Statsoft – Oklahoma – EUA) e os resultados com significância foram submetidos ao teste de Tukey em 5% de significância ($p < 0,05$). Os



tratamentos foram de acordo com as especiarias e etapas de adição no líquido, conforme Quadro 1.

Quadro 1 - Tratamentos e etapas de adição das especiarias

Tratamento	Especiaria	Etapas
C	Cúrcuma (1 g/L)	Maturação
P	Pimenta-do-reino (1,5 g/L)	Maturação
L	Lúpulo (5 g/L)	Final de fervura Dry Hopping
CP	Cúrcuma + Pimenta-do-reino	Maturação
LC	Lúpulo + Cúrcuma	Final de fervura Dry Hopping Maturação
LP	Lúpulo + Pimenta-do-reino	Final de fervura Dry Hopping Maturação
LCP	Lúpulo + Cúrcuma + Pimenta-do-reino	Final de fervura Dry Hopping Maturação
R	Sem especiarias	Controle

2.2 Análise de fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965) com modificações realizadas por Zhão et al, (2010) e Strail et al. (2006). Utilizou 0,5 mL da cerveja diluída e adicionou-se 0,5 mL de Folin – Ciocateu 0,9N, reagiu por 5 minutos e então adicionou 1 mL de Na₂CO₃ 10%. Após 1 hora de repouso, em temperatura ambiente, foi realizado a leitura em comprimento de onda de 760 nm e a medição comparada com uma curva padrão de ácido gálico e o resultado expresso em mg de GAE por litro de cerveja (mg GAE/L).

2.3 Atividade antioxidante DPPH

A capacidade de seqüestrar radicais livres foi determinada de acordo com o método de Brand-Williams et al. (1995), com modificações realizadas por Zhão et al, (2010) e Strail et al (2006).



Uma alíquota de 50 μL de cerveja diluída foi adicionada com 1 mL de metanol absoluto e com 0,5 mL de DPPH 250 μM . As amostras ficaram em repouso no escuro por 30 minutos e depois foi realizada a leitura em 517 nm e o resultado foi comparado com uma curva padrão de reagente trolox e o resultado expresso em mmol por litro de cerveja (mmol TE/L).

2.4 Atividade antioxidante FRAP

A atividade antioxidante pela redução do íon férrico foi determinada pela metodologia proposta por Tafulo et al (2010) com adaptações. Para formar a solução inicial misturou-se 25 mL de tampão de acetato (5 mM e pH de 3.6), com 2,5 mL de TPTZ (10 mM) dissolvido em HCl (40 mM) a 50 °C e 25 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 20 mM. Uma alíquota de 900 μL da solução descrita foi misturada, 30 μL da cerveja e 70 μL de água deionizada. A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos e a leitura de absorvância foi realizada em 593 nm.

Uma curva de Trolox para a calibragem em função da porcentagem de íon férrico seqüestrado foi confeccionada. O resultado expresso em mmol de Trolox equivalente por litro de cerveja, (mmol TE/L).

Resultados e Discussão

As análises foram em triplicata e os valores e desvio padrão para cada uma se encontram na tabela 1 abaixo.

Por análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey com significância de 0,05, observou-se que o conjunto de amostras não apresentou diferenças significativas, ou seja, as especiarias utilizadas não tiveram diferenças entre si e nem entre o lúpulo, insumo básico para a fabricação de cerveja. Conduziu-se o planejamento *simplex centróide* e analisou o comportamento das especiarias bem como os *blends* para ganhos potenciais no tempo de prateleira da bebida e a estabilidade do seu sabor.



Tabela 1. Resultado dos compostos fenólicos totais e das atividades antioxidantes nas bebidas

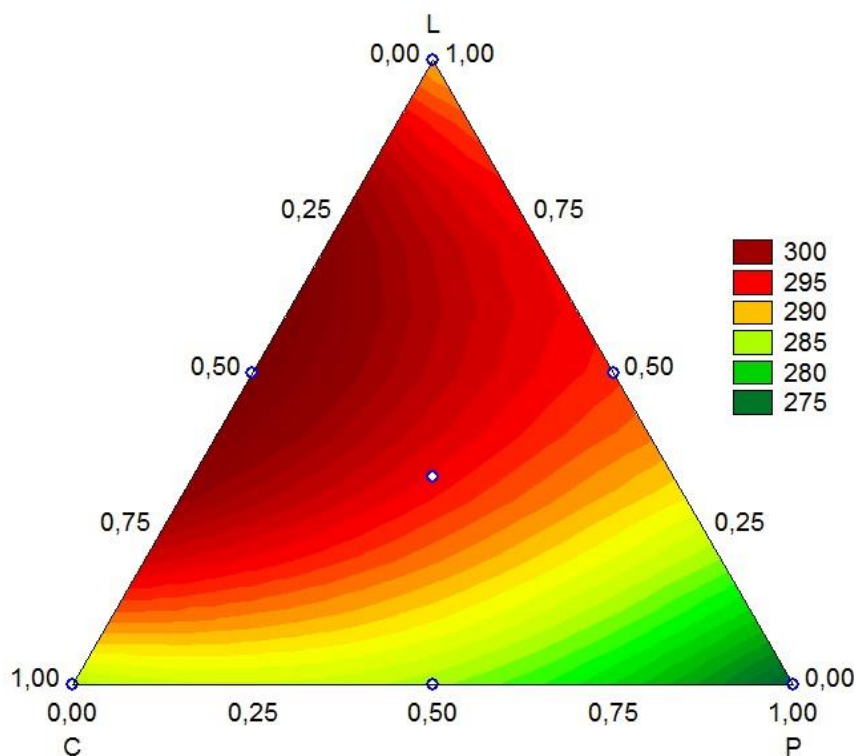
AMOSTRAS	Fenólicos totais (mg/L)	DPPH (mmol/L)	FRAP (mmol/L)
Cúrcuma	284,52 ± 8,24 ^a	0,73 ± 0,11 ^b	369,67 ± 22,74 ^c
Pimenta	272,74 ± 37,35 ^a	0,68 ± 0,06 ^b	360,33 ± 13,86 ^c
Lúpulo	289,76 ± 7,87 ^a	0,66 ± 0,03 ^b	368,33 ± 22,81 ^c
Pimenta+Cúrcuma	284,29 ± 8,21 ^a	0,64 ± 0,08 ^b	359,00 ± 16,82 ^c
Lúpulo+Cúrcuma	304,17 ± 16,68 ^a	0,58 ± 0,04 ^b	372,67 ± 17,04 ^c
Lúpulo+Pimenta	293,45 ± 7,33 ^a	0,59 ± 0,04 ^b	389,33 ± 4,72 ^c
Lúpulo+Pimenta+Cúrcuma	294,88 ± 6,04 ^a	0,64 ± 0,03 ^b	405,67 ± 15,82 ^c

3.1 Análise de fenólicos totais

Os resultados obtidos foram menores do que a cervejas do tipo *brown ale* apresentados por Granato et al. (2010) e superior as cervejas do tipo *lagers*. Os compostos fenólicos variam devido à qualidade e quantidade das matérias-primas utilizadas bem como as técnicas empregadas de produção de cerveja (PIAZON et al. 2010). Comparando os resultados de Zhao et al. (2010) as cervejas do tipo *lager* com adjuntos apresentam menores quantidades desses compostos, porém os resultados obtidos no estudo foram menores do que encontrados em cervejas européias como apresentado por Piazon et al. (2010) e Mitić et al. (2014).

Através do planejamento de mistura simplex centróide usando um modelo cúbico especial (R^2 de 0,898), conforme a figura 1 pode-se observar a contribuição de cada especiaria para a quantidade de fenólicos totais.

Figura 1 Superfície de resposta para compostos fenólicos



Ao observar a superfície é possível concluir que as maiores respostas encontravam-se respectivamente para o lúpulo, cúrcuma e pimenta, sendo *blend* de lúpulo e cúrcuma como o melhor resultado para o aumento dos compostos fenólicos, podendo ser observado no modelo preditivo apresentado a seguir, aonde compostos fenólicos totais (CPT), cúrcuma (C), pimenta-do-reino (P) e lúpulo (L):

$$CPT = (284,52 \times C) + (272,74 \times P) + (289,76 \times L) + (22,62 \times P.C) + (68,09 \times L.C) + (48,80 \times L.P) + (-80,00 \times L.P.C)$$

3.2 Análise de antioxidantes

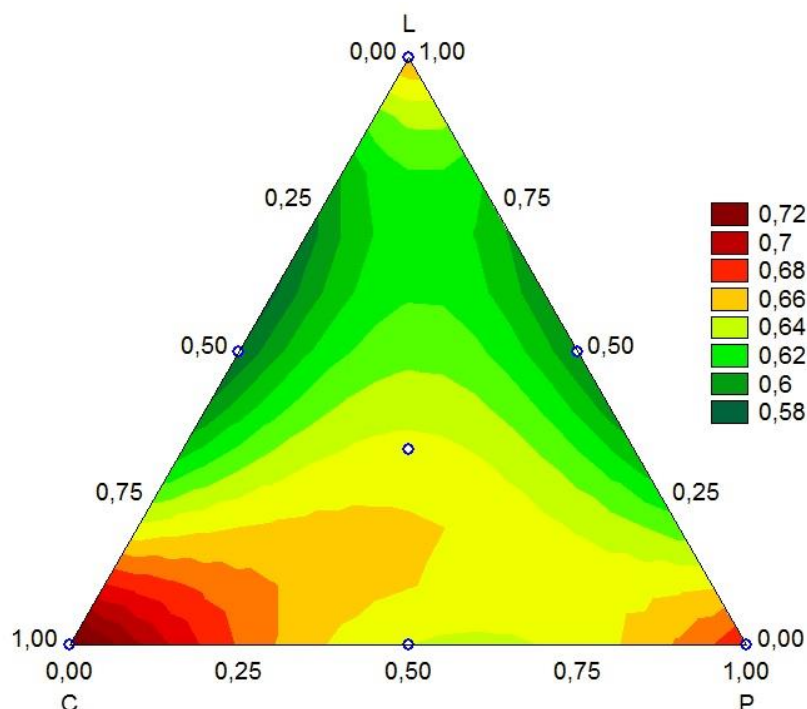
Os resultados obtidos para o DPPH foram similares aos resultados de cervejas européias encontrados por Mitić et al. (2014), porém os resultados foram inferiores a cervejas *ale* belgas e superiores a *lagers* com adjuntos encontrados por Tafulo et al. (2010) e Zhao et al. (2010). Já para as cervejas envelhecidas os valores encontrados foram similares a cervejas *lagers* de acordo com Zhao et al. (2010).

Os valores podem ser explicados devido à qualidade da matéria-prima utilizada e o processo de fabricação, devido a condições de transporte e armazenamento parte dos compostos que atuam como antioxidantes pode ser degradada diminuindo assim a sua atividade (ARON & SHELLHAMMER, 2010). Segundo Tafulo et al. (2010), cervejas do tipo *ale* apresentam uma capacidade antioxidante maior do que *lagers*, e essa capacidade é aumentada conforme a cerveja ganha cor, cervejas marrom avermelhadas apresentaram um poder antioxidante maior e com o



aumento do álcool essa atividade também foi aumentada conforme descrito também por Piazzon et al. (2010). Pelo planejamento de mistura *simplex centróide* usando um modelo cúbico especial (R^2 de 0,866), conforme a figura 2 pode-se observar o comportamento de cada especiaria para a atividade antioxidante.

Figura 2 Superfície de resposta para DPPH



Pela superfície de resposta observa-se que a especiaria que apresentou o melhor resultado foi à cúrcuma, seguida pela pimenta-do-reino e por final o lúpulo. Como no pH da cerveja a curcumina apresenta um equilíbrio ceto-enólico, nessa forma mais estável a molécula se transforma em uma ótima doadora de hidrogênio, fato que comprova as propriedades antioxidantes (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Segundo estudos de Suhaj et al. (2006), a pimenta-do-reino, tanto em forma de pó ou extrato, apresenta capacidade antioxidante devido aos seus compostos fenólicos e alcalóides. O modelo preditivo do planejamento encontra-se a seguir.

$$DPPH = (0,73 \times C) + (0,68 \times P) + (0,66 \times L) + (-0,26 \times P.C) + (-0,46 \times L.C) + (-0,32 \times L.P) + (1,86 \times L.P.C)$$

3.3 Atividade antioxidante FRAP

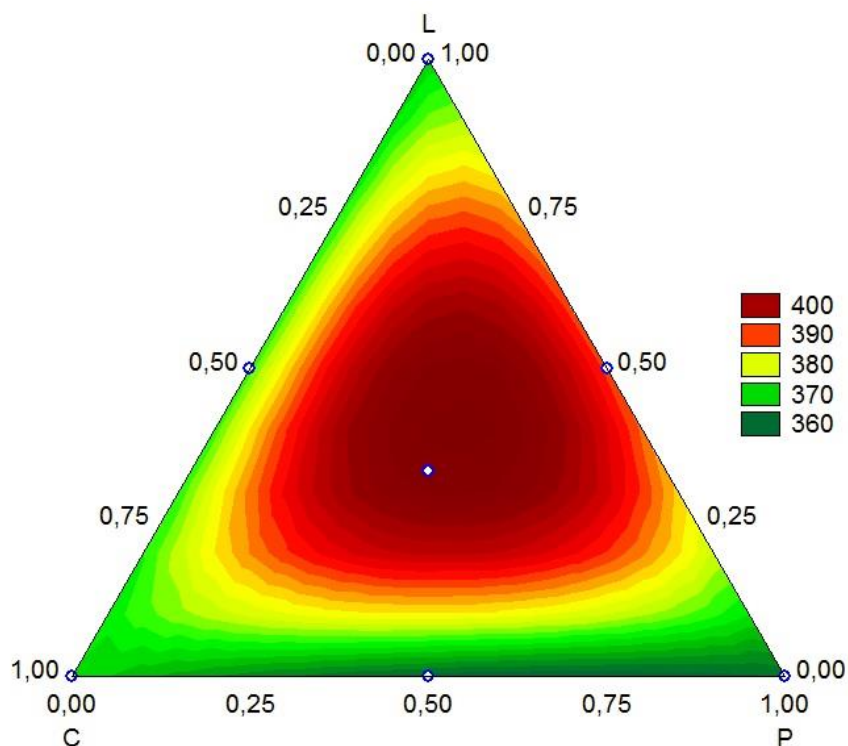
Foi observado que as análises em cervejas foram menores do que encontrado por Mitić et al. (2014) e similares ao encontrado por Tafulo et al. (2010) para cervejas *ale*. Com o armazenamento em garrafa a atividade antioxidante foi reduzida e seus valores foram superiores a cervejas *lagers* encontrada por Tafulo et al. (2010).

Foi obtido do planejamento um R^2 de 0,863 e conforme a superfície de resposta da figura 5 observa-se que a região central foi a qual apresentou as maiores respostas seguido do *blend*



entre o lúpulo e a pimenta do reino, as especiarias sozinhas apresentaram um valor menor do que quando misturadas sendo a pimenta-do-reino que apresentou o valor mais baixo. Um modelo preditivo foi gerado e encontra-se a seguir.

Figura 2 Superfície de resposta para DPPH



Conforme observado por Mitić et al. (2014), os compostos fenólicos que demonstraram maior capacidade de redução na análise do FRAP foram os ácidos cafeico, vanílico, sinapico e ferúlico devido a sua ligação em éster. Zhao et al. (2010) também confirma a (+)-catequina, (-)-epicatequina e o ácido protocatecuico como fenólicos que exibem alta atividade antioxidante. Com o modelo preditivo da superfície mostrado a seguir.

$$FRAP = (337,67 \times C) + (316,67 \times P) + (333,33 \times L) + (-26,00 \times P.C) + (-15,32 \times L.C) + (32,00 \times L.P) + (552,93 \times L.P.C)$$

4 Conclusão

As especiarias adicionadas nas cervejas apresentaram resultados próximos da cerveja adicionada lúpulo tanto para os compostos fenólicos como para as atividades antioxidantes. Pelos resultados é possível dizer que as especiarias usadas podem atuar como aditivos e conservantes naturais.

5 Referências bibliográficas

ARON, P. M. SHELLHAMMER, T. H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. Journal Institute of Brewing, 116, 369 – 380, 2010.



- BAMFORTH, C. W. **Beer Health and Nutrition**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W. CUVELIER, M. E. BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT - Food Science and Technology, 28, 25–30, 1995.
- CAO, L. ZHOU, G. GUO, P. LI, Y. Influence of Pasteurising Intensity on Beer Flavour Stability. Journal Institute of Brewing, 117(4), 587 – 582, 2011.
- DVOŘÁKOVÁ, M. GUIDO, L. F. DOSTÁLEK, P. SKULILOVÁ, Z. MOREIRA, M. M. BARROS, A. A. **Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts**. Journal Institute of Brewing, 114, 27 – 33, 2008.
- GRANATO, D. BRANCO, G. F. FARIA, J. A. F. CRUZ, A. G. **Characterization of Brazilian lager and Brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics**. Journal Science of Food and Agriculture, 91, 563 – 571, 2011.
- MITIĆ, S. S. PAUNOVIĆ, D. D. PAVLOVIĆ, A. N. TOŠIĆ, S. B. STOJKOVIĆ, M. B. MITIĆ, M. N. **Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia**. International Journal of Food Properties, 17, 908 – 922, 2014.
- PIAZZON, A. FORTE, M. NARDINI, M. **Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 10677 – 10683, 2010.
- SIERKSMA, A. KOK, F. J. **Beer and Health: From Myths to Science**. European Journal of Clinical Nutrition, 66, 869 – 870, 2012.
- SINGLETON, V. L. ROSSI, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagent**. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144–158, 1965.
- STRAIL, P. BOŘIVOJ, K. KUBÁŇ, V. **Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables – Evaluation of Spectrophotometric Methods**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 607 – 616, 2006.
- SUHAJ, M. RÁCOVÁ, J. POLOVKA, M. BREZOVÁ, V. **Effect of γ -irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.)**. Food Chemistry, 97, 696 – 704, 2006.
- SUETH-SANTIAGO, V. MENDES-SILVA, G. P. DECOTÉ-RICARDO, D. LIMA, M. E. F. **Curcumina, o pó do açafraão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas**. Química Nova, 38(4), 538 – 552, 2015.
- TAFULO, P. A. R. QUEIRÓS, R. B. DELERUE-MATOS, C. M. SALES, M. G. F. **Control and Comparison of the Antioxidant Capacity of Beers**. Food Research International, 43, 1702 – 1709, 2010.
- ZHAO, H. CHENA, W. LUB, J. ZHAO, M. (2010). **Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Commercial Beers**. Food Chemistry, 119, 1150 – 1158, 2010.