

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Kamila Patikowski Cheiran

Determinação do perfil de compostos fenólicos e nitrogenados de cervejas
artesanais por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Porto Alegre
2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Kamila Patikowski Cheiran

Determinação do perfil de compostos fenólicos e nitrogenados de cervejas
artesanais por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau em Mestre em Ciência
e tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Co-orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Cheiran, Kamila Patikowski

Determinação do perfil de compostos fenólicos e nitrogenados de cervejas artesanais por HPLC-DAD-ESI-MS/MS / Kamila Patikowski Cheiran. -- 2018.

121 f.

Orientador: Jeverson Frazzon.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Cerveja artesanal. 2. Compostos fenólicos. 3. Compostos nitrogenados. 4. HPLC-DAD-ESI-MS/MS. I. Frazzon, Jeverson, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Kamila Patikowski Cheiran
Farmacêutica

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

JEVERSON FRAZZON
Orientador – PPGCTA/UFRGS

ELISEU RODRIGUES
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS

ADRIANO BRANDELLI
Coordenador – Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos – PPGCTA/UFRGS

JULIANE ELISA WELKE

RAFAEL COSTA RODRIGUES

ROGERIO MARGIS

VITOR MANFROI
Diretor – Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jeverson Frazzon, pela oportunidade de realização de iniciação científica durante a graduação e por me convencer que é muito bom fazer pesquisa, mesmo passando por tantas dificuldades. Ainda, quero agradecer pelos ensinamentos, pelo apoio e pela confiança depositada em mim.

Ao Prof. Eliseu Rodrigues, por sempre me incentivar a estudar cada vez mais, pela paciência que teve comigo todo esse tempo, pelo apoio quando eu achava que nada mais daria certo, pelas tardes tomando café e identificando compostos, por todos os ensinamentos e por ter me emprestado sua aluna de iniciação científica.

Aos meus pais, Ida e Adalberto, que sempre me apoiaram e participaram de todas as minhas conquistas. Também quero agradecer pelas comidas deliciosas, por me pergundarem mil vezes se eu estou bem durante a escrita da dissertação, por fazer análises estatísticas e inúmeras tabelas e por me amarem tanto assim.

Ao meu irmão, Jean, que sempre foi um exemplo para mim, me apoiando em todos os momentos, tanto na hora de pesquisar e fazer análises estatísticas quanto na hora de ir ao shopping tomar um café e fazer compras.

As minhas colegas e amigas de laboratório, Alessandra (Baiana), Priscila e Michele (Mika) e ao meu colega e amigo de vida/laboratório, Luiz Henrique (Eru), por aguentarem as minhas loucuras, por me ajudarem em inúmeros momentos, por escutarem minhas músicas sem reclamar e por fazerem a minha vida mais feliz.

À Liliana (Lili), por me ensinar a ter mais paciência, ser menos rude e ser mais compreensiva, só que não! Brincadeira! A essa moça linda, mãe da Mona e da Mel (as gatas mais fofas que eu conheço), agradeço por todo carinho, pela paciência com a minha ogridice e pela companhia em inúmeros momentos (que nem sempre se faz presente, mas tudo bem...). Ainda, eu agradeço por ter entrado na minha vida para ficar para sempre.

À Victória, IC do Eliseu e minha amiga, por ter me ajudado em praticamente todas as análises, por ter me acalmado em momentos de pânico quando algo de errado acontecia, por ser extremamente dedicada e comprometida e por todas as risadas compartilhadas.

Aos amigos que fiz no ICTA, Andreza, Andressa, Luana e Raul, por me ajudarem a resolver diversos problemas tanto acadêmicos quanto não acadêmicos, pelas festinhas, pelas risadas e pelo apoio em todos os momentos.

A todos os meus amigos que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer desse mestrado.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
2.1. Etapas.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Mercado cervejeiro	13
3.2. Processo cervejeiro	14
3.3. Legislação.....	16
3.4. Matérias primas	17
3.4.1. Água	17
3.4.2. Malte.....	18
3.4.3. Lúpulo.....	20
3.4.4. Levedura.....	21
3.4.5. Adjuntos cervejeiros	22
3.5. Composição química da cerveja	23
3.5.1. Etanol	25
3.5.2. Compostos fenólicos	26
3.5.1. Compostos nitrogenados.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Produtos químicos e padrões	38
4.2. Amostragem.....	38
4.3. Características físico-químicas	39
4.3.1. Cor.....	40
4.3.2. Amargor.....	40
4.3.3. Grau Alcoólico e Extrato Primitivo	40

4.3.4. Análise Estatística	41
4.4. Determinação de compostos fenólicos e nitrogenados.....	41
4.4.1. Semi-purificação para análise em HLPC-DAD-ESI-MS/MS	41
4.4.2. Determinação dos compostos fenólicos e nitrogenados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Características físico-químicas	44
5.2. Determinação compostos de fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	47
5.3. Determinação de compostos nitrogenados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	64
6. CONCLUSÃO	73
7. PERSPECTIVAS	74
8. REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A – ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS FENÓLICO	91
APÊNDICE B – ESPECTRO DE MASSAS DOS COMPOSTOS NITROGENADOS	106
APÊNDICE C – TABELAS SUPLEMENTARES	110

RESUMO

As cervejas produzidas e consumidas no Brasil são provenientes, majoritariamente, de grandes indústrias como AB InBev e Heineken. No entanto, tem-se verificado que as microcervejarias têm ganhado cada vez mais espaço nesse mercado, produzindo as denominadas cervejas artesanais. Essas cervejas possuem composição química similar em relação aos compostos majoritários, porém, podem possuir diferenças em relação aos compostos minoritários de relevância para as características sensoriais das cervejas, tais como compostos fenólicos e alguns compostos nitrogenados. Considerando que não existem estudos na literatura que tenham avaliado o perfil de compostos fenólicos e nitrogenados em cervejas artesanais, neste trabalho foi utilizada a técnica de HPLC-DAD-ESI-MS/MS para determinação do perfil desses compostos em cervejas artesanais dos estilos IPA, Pilsen e Weiss (n=27). Além disso, foram realizadas análises físico-químicas de cor, amargor, teor alcoólico e extrato primitivo com as cervejas artesanais dos três estilos (n=81). Um total de 57 compostos fenólicos foi encontrado, sendo que os 12 seguintes compostos foram encontrados pela primeira vez em cerveja: ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido 2,3-dihidroxibenzóico, ácido dimetoxibenzóico, ácido 3-*p*-cumaroilquínico, ácido 4-*p*-cumaroilquínico, taxifolin hexosídeo, quercetina di-hexosídeo, ácido 3-feruloilquínico, ácido 4-feruloilquínico, ácido 5-feruloilquínico, apigenina-6,8-C-diarabinosídeo e isofraxidin hexosídeo. Ainda, foram encontrados 15 compostos nitrogenados, incluindo os compostos das classes dos benzoxazinoides e das fenolamidas. Os benzoxazinoides ainda não haviam sido relatados em cervejas do estilo IPA e Pilsen e as fenolamidas não haviam sido relatadas em cervejas do estilo IPA e Weiss. O perfil qualitativo dos compostos fenólicos e nitrogenados das cervejas artesanais é semelhante. Todavia, para as cervejas do estilo Weiss, 12% dos compostos fenólicos estavam ausentes em relação aos compostos fenólicos presentes nas cervejas dos estilos IPA e Pilsen.

Palavras-chave: cerveja artesanal; compostos fenólicos; compostos nitrogenados; HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

The beers produced and consumed in Brazil come mainly from major industries such as AB InBev and Heineken. However, in recent years the craft beer market has gained more space in the consumer market, producing the so-called craft beers. These beers have similar chemical composition in relation to the major compounds, however, they have differences in relation to the minority compounds of relevance for the sensorial characteristics of the beers, such as phenolic compounds and some nitrogen compounds. Considering that there are no studies in the literature that have evaluated the profile of phenolic and nitrogen compounds in craft beers, in this work the HPLC-DAD-ESI-MS/MS technique was used to determine the profile of these compounds in craft beers of IPA, Pilsen and Weiss styles (n = 27). In addition, physical-chemical analyses of color, bitterness, alcohol content and primitive extract were performed with the craft beers of the three styles (n = 81). A total of 57 phenolic compounds were found, the following 12 compounds being found for the first time in beer: 2,4-dihydroxybenzoic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, dimethoxybenzoic acid, 3-*p*-coumaroylquinic acid, 4-*p*-coumaroylquinic acid, taxifolin hexoside, quercetin dihexoside, 3-feruloylquinic acid, 4-feruloylquinic acid, 5-feruloylquinic acid, apigenin-6,8-C-diarabinoside and isofraxidin hexoside. In addition, 15 nitrogen compounds were found, including compounds of the benzoxazinoid and phenolamide classes. Benzoxazinoids had not yet been reported in IPA and Pilsen style beers and phenolamides had not been reported in IPA and Weiss style beers. The qualitative profile of the phenolic and nitrogen compounds of the craft beers is similar. However, for Weiss-style beers, 12% of the phenolic compounds were absent in relation to the phenolic compounds present in the IPA and Pilsen style beers.

Keywords: craft beer; phenolic compounds; nitrogen compounds; HPLC-DAD-ESI-MS / MS.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior país produtor e consumidor de cervejas do mundo, sendo que grandes empresas como AB InBev e Heineken representam a maior parcela desse mercado (Barth et al., 2017, Grupo Kirin, 2015). Recentemente, as cervejas artesanais têm atraído mais consumidores devido às características sensoriais diferenciadas quando comparado às cervejas produzidas pelas grandes companhias. Dessa forma, esse mercado tem ganhado mais evidência nos últimos anos (Sebrae Nacional, 2017).

A cerveja é produzida basicamente a partir de água, malte, lúpulo e leveduras (Briggs et al., 2004; Eaton, 2006). Esta bebida é majoritariamente composta por água e etanol, e em menor quantidade por carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais (Gaetano et al., 2016). Ainda dentre os compostos minoritários presentes na cerveja, podemos destacar os compostos fenólicos (Callemien & Collin, 2010) e os compostos nitrogenados (Pihlava, 2014; Pihlava & Kurtelius, 2016).

Os compostos fenólicos podem influenciar nas características sensoriais da cerveja, conferindo sabor amargo e adstringente à bebida (Callemien & Collin, 2010). Esses compostos possuem capacidade antioxidante, podendo estar relacionados com a estabilidade oxidativa das cervejas (Vanderhaegen, et al., 2006). Por sua vez, os compostos fenólicos são parcialmente responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde atribuídos ao consumo de cerveja, como a redução do risco de doenças cardiovasculares, o que, por hipótese, está relacionado à capacidade antioxidante dessa classe de compostos (Gaetano et al., 2016).

Os compostos nitrogenados foram recentemente identificados na cerveja, e alguns deles podem estar relacionados com características sensoriais dessa bebida (Pihlava, 2014; Pihlava & Kurtelius, 2016).

A concentração e os tipos de compostos fenólicos e nitrogenados presentes nas cervejas variam com o estilo de cerveja (Piazzon et al., 2010), sendo estes influenciados diretamente pela composição das suas matérias-primas, que variam conforme as características genéticas das plantas e as condições ambientais de cultivo. O processo de fabricação e produção da cerveja também influenciam esses componentes (Vanderhaegen et al., 2006). Frequentemente, cervejarias de grande

porte utilizam recursos alternativos a fim de diminuir o custo da produção, como utilização de fontes de carboidratos menos dispendiosos que malte, por exemplo, milho e outros cereais não maltados. Diferente do que é realizado em cervejarias artesanais onde, geralmente, não são utilizadas outras fontes de carboidratos além do malte (Júnior et al., 2014). A utilização de matérias primas variadas, por exemplo cevada, lúpulo, trigo, centeio, aveia e milho, na produção de cerveja pode estar relacionada com a presença e a concentração de diferentes compostos fenólicos e nitrogenados.

Há estudos com diferentes tipos de cerveja nos quais já foram identificados diversos compostos fenólicos e alguns compostos nitrogenados (Heuberger et al., 2016; Oladokun, et al., 2016; Pihlava, 2014; Rada-Quifer, et al., 2015; Pihlava & Kurtelius, 2016). No entanto, não existem estudos na literatura (pesquisa realizada no Scopus e Science direct) que tenham avaliado o perfil de compostos fenólicos e nitrogenados em cervejas artesanais. Desde modo, esse trabalho teve o objetivo de identificar compostos fenólicos e nitrogenados presentes em cervejas artesanais, visto que esses compostos podem estar relacionados com características sensoriais da cerveja e com possíveis efeitos benéficos à saúde atribuídos ao consumo dessa bebida.

2. OBJETIVO

Determinar os compostos fenólicos e nitrogenados de cervejas artesanais produzidas no Rio Grande do Sul por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

2.1. Etapas

- 1ª Determinação dos tipos de estilo de cervejas artesanais por meio de pesquisa em cervejarias e em locais de comercialização de cerveja;
- 2ª Coleta das amostras de cerveja do tipo Pilsen, Weiss e IPA de três lotes diferentes;
- 3ª Determinação da cor e do amargor das cervejas por métodos da EBC (European Brewery Convention).
- 4ª Determinação do teor alcoólico e do extrato primitivo por densímetro eletrônico acoplado a espectrofotômetro de infravermelho próximo (*Alcolyzer beer*);
- 5ª Determinação do perfil dos compostos fenólicos e nitrogenados das cervejas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mercado cervejeiro

A cerveja é uma das bebidas mais antigas da humanidade e é considerada uma das bebidas mais populares do mundo (Colen & Swinnen, 2010). Em 2016, a produção mundial de cerveja foi de aproximadamente 1957,5 milhões de hectolitros sendo que o Brasil ocupa a terceira posição entre os países que mais produzem cerveja, a China e os Estados Unidos ocupam a primeira e segunda posição, respectivamente (Barth et al., 2017). Segundo a Companhia Kirin, em 2015, o Brasil foi o terceiro maior consumidor de cerveja no mundo (Kirin Beer University Report, 2015).

As cervejas produzidas e consumidas no Brasil são provenientes, majoritariamente, de grandes indústrias como AB InBev e Heineken (Barth et al., 2017). Assim, essas empresas ocupam a maior parcela de produção e de comercialização de cervejas, representando 99% do mercado, segundo pesquisa realizada pelo Sebrae em 2017. Essas cervejarias produzem basicamente cervejas do tipo *Lager*, conhecidas tradicionalmente como cervejas de baixa fermentação, em virtude das leveduras não formarem colônias na superfície do líquido e, ao invés disso, decantam no fundo do fermentador. O restante do mercado cervejeiro, apenas 1%, é representado pelas microcervejarias. Contudo, tem-se verificado que essas microempresas têm ganhado cada vez mais espaço nesse mercado (Sebrae Nacional, 2017). Em 2005, haviam 46 microcervejarias registradas no MAPA, em 2015 esse número aumentou para 372 microcervejarias, um crescimento de mais de 800% em 10 anos (Instituto da Cerveja Brasil, 2016).

As microcervejarias se caracterizam pela produção de diferentes tipos de estilo de cervejas em pequena ou média escala. Essas empresas, frequentemente, produzem cervejas cumprindo a Lei da Pureza Alemã, que estabelece que as únicas matérias-primas que podem ser utilizadas para produção de cerveja são água, malte, lúpulo e levedura, sendo proibido o uso de qualquer conservante ou adjunto

cervejeiro não maltado (Júnior et al., 2014; Sebrae Nacional, 2017). Esta é uma das características que diferencia as cervejas artesanais ou especiais das cervejas produzidas pelas empresas de grande porte, visto que a legislação brasileira permite que parte do malte seja substituído por adjuntos cervejeiros em uma proporção de até 45% do peso (BRASIL, 2009). Os adjuntos cervejeiros são uma fonte barata de carboidratos, diminuindo, assim, o custo da produção. Ainda, outra característica que diferencia as cervejas artesanais das cervejas industrializadas é o tempo de processamento. Para a produção de alguns tipos de estilo de cerveja artesanais o processo pode demorar meses desde a mosturação até o envase. Já em cervejas das grandes empresas esse processo, normalmente, ocorre em poucos dias devido à utilização de técnicas que aceleram o processo. Devido às diferenças na produção, as cervejas artesanais apresentam cor, aroma e sabor diferenciados em relação às cervejas das empresas de grande porte (Júnior et al., 2014). Por exemplo, o maior tempo de produção permite que diversos compostos de interesse sensorial sejam produzidos e compostos indesejados sofrerem modificações químicas que alteram essas características (Vanderhaegen et al., 2006). São essas particularidades das cervejas artesanais que têm atraído mais consumidores e com isso esse mercado tem ganhado mais evidência nesses últimos anos.

3.2. Processo cervejeiro

Apesar das cervejas artesanais possuírem características sensoriais diferentes das cervejas das grandes empresas, elas são produzidas basicamente seguindo o mesmo processo de fabricação. De modo geral, esse processo pode ser simplificado em quatro etapas distintas: (a) mosturação, (b) fervura, (c) fermentação e (d) maturação (Bamforth, 2000; Keukeleire, 2000; Briggs et al., 2004; Eaton, 2006).

- a) Na mosturação, os grãos de malte moídos são hidratados com água quente com a finalidade de completar a extração de açúcares fermentáveis e clivar proteínas por meio de enzimas amilases e proteases, respectivamente, processo já iniciado durante a malteação (Briggs, et al., 2004). Essa etapa é muito importante, pois ocorre um

processo enzimático, no qual os monossacarídeos e os aminoácidos são liberados pela clivagem dos carboidratos e proteínas pelas enzimas amilases e proteases, respectivamente. Esses compostos são fundamentais uma vez que são utilizados como fonte de carbono e nitrogênio pelas leveduras durante a etapa de fermentação. Os métodos utilizados nessa etapa são extração por infusão simples ou com várias rampas de temperatura (com o objetivo das enzimas atuarem em suas faixas de temperatura ótima) ou extração por decocção, sendo que cada empresa determina qual dos processos será utilizado para cada estilo de cerveja (Bamforth, 2000).

- b) Logo após a mosturação, o mosto é filtrado e segue para a etapa de fervura, na qual o lúpulo é adicionado e geralmente esta etapa é realizada por cerca de 90 minutos. Esta etapa tem a finalidade de extrair e isomerizar os α -ácidos do lúpulo, inativar enzimas, eliminar bactérias e fungos, coagular proteínas, evaporar compostos indesejados presentes no lúpulo, promover a formação de melanoidinas (reação de Maillard), caramelos (reação de caramelização) de açúcares (importante para alguns estilos de cerveja) e, evaporar a água, a fim de concentrar o mosto ao volume e densidade adequados (Keukeleire, 2000; Houseman & Bickham, 2012).
- c) A seguir, o mosto é filtrado, resfriado e transferido para o tanque de fermentação, na qual a levedura de interesse será adicionada, geralmente, do gênero *Saccharomyces*. Eventualmente, há a adição de bactérias, como do gênero *Lactobacillus*, e outros gêneros de levedura, como *Brettanomyces*, para a produção de determinados estilos de cerveja. Durante essa etapa a grande maioria dos açúcares fermentáveis do mosto são metabolizados a etanol, gás carbônico e metabólitos secundários como ésteres, alcoóis superiores, diacetil e compostos de enxofre que influenciam no sabor e no aroma do produto final (Tenge, 2009; Hanning e Bickham, 2012).
- d) Finalmente, após a fermentação, a cerveja segue para o processo de maturação, no qual a cerveja é armazenada a baixas temperaturas,

normalmente acima de 3°C, por um determinado período de tempo, variando conforme o estilo. No decorrer dessa etapa, ocorre a clarificação da cerveja por precipitação das leveduras, das proteínas e dos sólidos solúveis. Ainda, ocorre a metabolização de alguns subprodutos produzidos durante a etapa de fermentação, o que normalmente, melhora as características sensoriais da cerveja. Após a maturação, a cerveja é filtrada, envasada e pasteurizada com a finalidade de aumentar sua vida de prateleira (Keukeleire, 2000, Briggs, et al., 2004). Quando a cerveja não é pasteurizada é denominada de chope, sendo necessário o armazenamento refrigerado e o consumo em curto prazo (BRASIL, 2009).

3.3. Legislação

No Brasil, a legislação vigente que regulamenta a fabricação de cerveja está presente no Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas (BRASIL, 2009). Segundo esse decreto as cervejas são classificadas quanto ao extrato primitivo, à cor, ao teor alcoólico, à proporção de malte de cevada e à fermentação.

- Extrato primitivo: o extrato primitivo é a quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto, que deu origem à cerveja e se expressa em porcentagem (%) em peso. Para esse parâmetro a cerveja é classificada como leve (maior ou igual a 5,0% e menor do que 10,5% em peso), cerveja (maior ou igual a 10,5% e menor do que 12,0% em peso), cerveja extra (maior ou igual a 12,0% e menor ou igual a 14,0% em peso) e cerveja forte (maior do que 14,0% em peso);

- Cor: quanto à cor, a cerveja pode ser denominada de três formas: clara (menos de 20 unidades EBC - European Brewery Convention), escura (vinte ou mais unidades EBC) e colorida (fora da escala preconizada pela EBC, devido à adição de corante);

- Teor alcoólico: em relação ao teor alcoólico, as cervejas podem ser classificadas em cerveja sem álcool, cujo conteúdo alcoólico é inferior ou igual a 0,5% em volume (0,5% vol.) e com álcool no qual o conteúdo alcoólico é superior a 0,5% em volume (0,5% vol.);

- Malte de cevada: conforme a proporção de malte de cevada a cerveja é classificada como puro malte (apresenta 100% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo), cerveja (apresenta 55% ou mais de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo) e “cerveja de...”, seguida do nome do vegetal predominante (apresenta entre 20 e 55% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo);

- Fermentação: quanto à fermentação a cerveja é classificada como de alta fermentação ou baixa fermentação.

3.4. Matérias primas

A cerveja é produzida a partir de água, malte (produto resultante da germinação parcial dos grãos da cevada), lúpulo, levedura e adjuntos cervejeiros. Para cada estilo de cerveja há determinada composição química da água, tipo e grau de torrefação do malte, variedade do lúpulo e espécie de levedura que serão utilizados para sua fabricação. Ainda, em alguns tipos de cerveja podem ser empregados outros cereais maltados, cereais não maltados e outros adjuntos que sejam fonte de açúcares fermentáveis (Briggs et al., 2004; Eaton, 2006).

3.4.1. Água

A qualidade da água influencia diretamente as características da cerveja. Frequentemente, pode-se utilizar água potável, porém, algumas vezes é necessária a realização de alguns ajustes químicos, como a eliminação do cloro de água

proveniente das estações de tratamento. Nesses casos o cloro é retirado por meio de fervura ou filtração com carvão ativado (Wotring, 2012).

O bicarbonato (HCO_3^-) é considerado o ânion mais importante no processo cervejeiro, visto que é responsável por neutralizar a acidez de alguns tipos de maltes e por reduzir a alcalinidade do mosto por meio da reação com o íon cálcio (Ca^{+2}). Por sua vez, o cátion mais importante para a produção de cerveja é Ca^{+2} , pois durante a mosturação reagem com HCO_3^- , formando água, gás carbônico e um precipitado de bicarbonato de cálcio que é retirado no final da mosturação. O gás carbônico é liberado durante a fervura o que desloca a reação no sentido dos produtos, reduzindo a alcalinidade da solução. Os íons de cálcio ainda podem reagir com fosfatos, formando precipitado de fosfato de cálcio, liberando íons de hidrogênio que reduzem a alcalinidade do mosto (Bamforth, 2000; Briggs et al., 2004). Essas são algumas das reações mais importantes no aumento da acidez do mosto, visto que o pH da solução precisa variar entre 5,2 a 5,7 para que as proteases e amilases atuem de forma apropriada. Algumas vezes, a água apresenta uma elevada alcalidade e somente essa reação não é suficiente para que a alcalinidade seja reduzida, sendo necessário, por exemplo, o ajuste do mosto com ácido láctico (Wotring, 2012).

3.4.2. Malte

A cevada (*Hordeum vulgare*) é o grão de cereal mais comumente maltado para produção de cerveja. A malteação da cevada é realizada por meio da submersão dos grãos em água por determinado tempo e temperatura, e posterior secagem. Esse processo permite a germinação parcial dos grãos com o objetivo de converter enzimaticamente o amido, reserva energética da cevada, em açúcares mais simples que serão utilizados pelas leveduras durante a etapa de fermentação (Britannica Academic, 2017).

A torrefação do malte é a etapa seguinte a malteação, na qual os grãos são torrados a determinadas temperaturas dependendo do tipo de malte que se deseja produzir. A partir da combinação do grau de modificação do grão obtido na

malteação e do grau de torrefação do malte se pode produzir vários tipos de malte com diferentes cores, aromas e sabores (Figura 1). A variação das características sensoriais dos maltes é importante para a produção dos diferentes tipos de estilo de cerveja, pois para cada tipo de cerveja é utilizado um ou mais tipos de malte, conferindo características específicas a cerveja (Briggs et al., 2004).

Figura 1. Diferentes graus de torrefação da cevada. Conforme aumento da tonalidade da cor há aumento do grau de torrefação da cevada.



Fonte: frenchandjupps.com

A cor da cerveja é uma das características mais importantes de todos os tipos de estilo de cerveja. É diretamente influenciada pelo tipo de malte que é utilizado, mas a intensidade e o tempo de fervura do mosto, e a adição que alguns adjuvantes como caramelo e corantes naturais também podem auxiliar no desenvolvimento da cor desejada para determinado estilo de cerveja (Sapsis, 2012). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2009) a escala que deve ser utilizada para determinar a cor da cerveja é a EBC. O método utilizado para isso é a medida da absorbância a 430nm, em espectrofotômetro UV/VIS, da cerveja diluída contra um branco de água (EBC, 2000).

Os grãos de cevada possuem em sua composição carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (Callemien & Collin, 2010). No entanto, a concentração desses compostos varia conforme a variedade e o grau de torrefação da cevada utilizado e conforme condições do solo e do ambiente, como temperatura, umidade relativa do ar e duração total de exposição ao sol (Kreisz, 2009).

3.4.3. Lúpulo

Os lúpulos cervejeiros foram provavelmente introduzidos na fabricação da cerveja com a finalidade de promover estabilidade bacteriológica à bebida (Briggs et al., 2004). Esse ingrediente é o responsável pelo sabor amargo da cerveja, também influenciando o “*flavor*”. Além disso, auxilia na formação de complexos insolúveis com proteínas e polipeptídeos, contribuindo para a estabilidade coloidal da cerveja, e colabora na estabilização da espuma (Keukeleire, 2000). Comercialmente, estão disponíveis as seguintes formas de lúpulos: (a) em flores (cone seco do lúpulo), (b) em *pellets*, ou (c) em extratos (Figura 2). Contudo, normalmente a forma mais utilizada são os *pellets*, visto que na forma de flores é necessário o armazenamento do produto sob refrigeração (Krottenthaler, 2009) e na forma de extrato é essencial que o produto final seja isento do solvente presente no extrato (BRASIL, 2009). Sendo assim, os *pellets* são preferidos devido a sua praticidade de utilização (Garofalo, 2012).

Figura 2. Formas comercialmente disponíveis dos lúpulos.

A) Cones secos



B) Pellets



C) Extrato



Fontes: A) <https://www.amazon.com/Bulk-Herbs-Flowers-Whole-Organic/dp/B00JLR8C9E>;
B) <https://www.morebeer.com/products/centennial-pellet-hops.html> e
C) <https://www.homebrewcentre.co.uk/isomerised-hop-extract-28ml>.

Os lúpulos são flores femininas, ou cones, da espécie *Humulus lupulus*, que apresentam glândulas de lupulina onde se concentram os compostos químicos de interesse para a indústria cervejeira. A resina presente nessas glândulas contém óleos essenciais, α -ácidos e, em pequenas proporções, β -ácidos, que contribuem para o amargor, o aroma e o sabor da cerveja. A concentração desses compostos

difere conforme as variedades dos lúpulos, que normalmente são classificados como lúpulos de aroma e lúpulos de amargor, embora algumas variedades sejam classificadas como “multiuso”. As variedades de lúpulos de aroma apresentam compostos aromáticos mais agradáveis e amargor sutil, possuindo, geralmente, uma concentração baixa de α -ácidos. Os lúpulos de amargor contêm um alto teor de α -ácidos, contudo, suas características de aroma e sabor, normalmente, não são tão refinadas quando comparadas aos lúpulos de aroma (Bamforth, 2000; Krottenthaler, 2009; Briggs et al., 2004; Garofalo, 2012).

O amargor é uma das características mais relevantes no momento da escolha do estilo de cerveja pelos consumidores. Sendo assim, muitos fabricantes têm descrito no rótulo do produto a Unidade Internacional de Amargor (*International Bittering Unit*), sendo mais utilizada a sigla IBU. Por meio do IBU são estimados os compostos amargos da cerveja, que são principalmente os α -ácidos isomerizados. Essa mudança conformacional da molécula dos α -ácidos ocorre durante a etapa da fervura, e torna esses compostos mais solúveis no mosto (Briggs et al., 2004). A técnica que é realizada para determinação do IBU é a extração em fase líquida com iso-octano, seguida da medida da absorbância a 275 nm em espectrômetro UV/VIS (EBC, 2004).

3.4.4. Levedura

As leveduras *Saccharomyces cerevisie* e *Saccharomyces pastorianus* são geralmente utilizadas para a produção de cerveja. A primeira é denominada levedura *ale* ou de alta fermentação, assim chamadas, pois formam colônias que são sustentadas pela tensão superficial do mosto fermentado. As leveduras do gênero *S. pastorianus* são chamadas de leveduras *lager* ou de baixa fermentação, pois floculam no fundo do fermentador. Há diversas linhagens dessas duas espécies de leveduras que são utilizadas para fabricação de cerveja, sendo preciso escolher corretamente a linhagem para que seja adequada para o estilo de cerveja que se deseja produzir (Briggs et al., 2004; Hanning e Bickham, 2012).

Apesar das leveduras *ale* e *lager* fazerem parte do mesmo gênero de leveduras, elas apresentam várias diferenças que tem consequências vitais para o processo de fabricação de cerveja. Como principais diferenças entre essas duas espécies de levedura pode-se incluir sua capacidade fermentativa, taxa de utilização de açúcar, tolerância à temperatura, características de floculação, tolerância ao etanol, exigência de oxigênio e perfil de compostos de aroma e sabor que são produzidos (Eßlinger, 2009).

As leveduras do tipo *ale* podem utilizar como fonte de carbono os açúcares mais simples como glicose, frutose, maltose e sacarose, no entanto, fermenta parcialmente a rafinose, que é um trissacarídeo composto por frutose, glicose e galactose. Essa fermentação é parcial, pois as leveduras *ale* não apresentam a enzima α -galactosidase que cliva a ligação entre a glicose e galactose, sendo assim esses dois açúcares da rafinose não são utilizados como fonte de carbono (Russell, 2006). Ainda, a temperatura ideal de multiplicação dessas leveduras é entre 13 a 24°C e algumas variedades podem fermentar até a presença de 12% de etanol. Como exemplo de cervejas produzidas com leveduras *ale*, pode-se citar alguns tipos Weiss (cervejas que utilizam trigo para sua fabricação) e Indian Pale Ale (IPA, cervejas que apresentam amargor elevado devido a adição de grandes quantidades de lúpulo) (Hanning e Bickham, 2012).

As leveduras *lager* podem fermentar açúcares simples, como os citados anteriormente, além de ser capaz de clivar completamente a rafinose, utilizando os três monossacarídeos desse açúcar. Essa espécie de levedura se multiplica melhor entre a temperatura de 8 a 13°C e tolera até 8% de etanol por volume, normalmente. As cervejas dos estilos Pilsen, Helles, Dunkel e Viena são exemplos de cervejas que são produzidas com leveduras *lager* (Eßlinger, 2009; Hanning e Bickham, 2012).

3.4.5. Adjuntos cervejeiros

Um adjunto cervejeiro, segundo o Decreto nº 6.871 de 2009, é definido como a adição de cevada cervejeira e demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, assim como os amidos e açúcares de origem vegetal.

Esses adjuntos podem ser sólidos, como os cereais maltados e não maltados, ou líquidos, como derivados de cana de açúcar (BRASIL, 2009).

Entre os cereais maltados que são mais utilizadas na fabricação da cerveja podemos citar o trigo (*Triticum aestivum*), sendo considerado o cereal mais utilizado depois da cevada. Outros cereais como sorgo (*Sorghum vulgare*), centeio (*Secale cereale*) e aveia (*Avena sativum*) também podem ser maltados e utilizados na produção da cerveja, entretanto esses são normalmente utilizados crus (Briggs et al., 2004).

A substituição de parte da cevada maltada por cereais não maltados é uma estratégia econômica importante que visa diminuir os custos da produção. No Brasil, o cultivo de milho (*Zea mays*) e de arroz (*Oryza sativa*) é expressivamente maior que o cultivo de cevada, sendo assim muito utilizado pelas indústrias cervejeiras. Contudo, antes de serem adequados para a produção de cerveja esses cereais precisam ser processados. Os açúcares devem ser gelatinizados antes da mostura inicial por meio de fervura dos grãos, por exemplo. Ainda outros cereais não maltados que podem ser utilizados são a cevada, o centeio e o trigo em flocos (Meussdoerffer e Zarnkow, 2009).

Como adjuntos líquidos, os derivados de cana-de-açúcar e de beterraba, xaropes a base de sacarose, xarope de maltodextrina, xarope de amido hidrolizado e extrato de malte são comumente usados como uma fonte de carboidratos fermentáveis de baixo valor econômico. No entanto, estes não são completamente fermentáveis e tendem a gerar cervejas com teores de álcool mais elevado. O caramelo, o melado e xarope de bordô são outros adjuntos utilizados na indústria de cervejeira com a finalidade de fornecer, além de carboidratos fermentáveis, cor e sabor ao produto acabado (Sapsis, 2012; Bogdan, 2017).

3.5. Composição química da cerveja

Na cerveja já foram identificados mais de 450 compostos, pertencentes a diferentes classes químicas (Callemien & Collin, 2010; Gaetano, et al., 2016). A

maior parte desses compostos é proveniente das matérias-primas que são utilizadas durante a fabricação da cerveja. Todavia, outros compostos, como de aroma e sabor, são formados durante o processamento. Diversos se mantêm inalterados desde as etapas iniciais até o produto acabado, outros, no entanto, sofrem diversas modificações (Briggs et al., 2004).

A composição química da cerveja varia conforme as matérias-primas utilizadas, o processo de fabricação de cada empresa e o estilo que se deseja produzir. Na **Tabela 1** é mostrada a composição química típica de uma cerveja do tipo *lager*, estilo mais consumido mundialmente.

Tabela 1. Composição química de uma cerveja do estilo *lager*.

Componente	Unidade	Valor médio em 100 mL de cerveja
Água	g	90 - 98
Etanol	% (v/v)	4,2 - 5,8
Carboidratos	g	2,9 - 3,6
Proteínas	g	0,34 - 0,46
Vitaminas	mg	0,6 - 0,8
Minerais	mg	55 - 74
Compostos fenólicos	mg	0,28 - 9

Fontes: Callemien & Collin, 2010; Astrup et al., 2016; Gaetano et al., 2016.

Há estudos com diferentes tipos de cerveja (*lager*, *Pilsen*, *Mäuzenbier*, *cervejas de trigo* e *cerveja de centeio*) nos quais já foram identificados diversos compostos fenólicos e alguns compostos nitrogenados (Heuberger et al., 2016; Oladokun et al., 2016; Pihlava, 2014; Rada-Quifer et al., 2015; Pihlava & Kurtelius, 2016). Entretanto, para nosso conhecimento não foram encontrados estudos na literatura (pesquisa realizada no Scopus e Science direct) que tenham analisado o perfil de compostos fenólicos e nitrogenados em cervejas artesanais. As pesquisas realizadas até o momento avaliam apenas compostos de uma das classes, fenólicos ou nitrogenados.

3.5.1. Etanol

O etanol é o componente não aquoso majoritário na cerveja. Os efeitos relacionados ao consumo de etanol podem ser considerados benéficos ou prejudiciais à saúde dependendo da quantidade ingerida e do padrão de consumo do etanol, apesar de ser classificado como carcinogênico para humanos, segundo a IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer). Muitas pesquisas descrevem as curvas em forma de J, na qual pessoas que consomem levemente e moderadamente álcool — 330 mL de cerveja com teor alcoólico de 4% (Gaetano et al., 2016) — tem menos risco de mortalidade que os indivíduos abstêmios e das pessoas que consomem etanol de modo abusivo (Di Castelnuovo et al., 2006; Costanzo et al., 2010; Thompson, 2013). Portanto, o consumo elevado de etanol pode aumentar o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer como cólon, reto e fígado, lesões hepáticas, doenças cardiovasculares, além de causar dependência química e psíquica (Gaetano et al., 2016; Rehm & Roerecke, 2017).

Segundo Jayasekara e colaboradores, a relação encontrada entre o consumo de etanol e o risco de mortalidade por todas as causas foi curvilínea para homens, na qual a ingestão moderada de etanol era benéfica à saúde. Em contrapartida, o aumento do consumo eleva o risco de mortalidade quando mensurado ao longo do tempo. Para mulheres esses autores relatam que devido ao pequeno número de estudos associados aos riscos relativos a este grupo, não foi possível estabelecer a relação entre consumo de etanol e risco de mortalidade (Jayasekara et al., 2014).

Segundo diversos estudos epidemiológicos o consumo moderado de etanol está relacionado com a redução de risco de doenças cardiovasculares, (DCV) principalmente, doença cardíaca coronariana (Brien et al., 2011; Arranz et al., 2012; Thompson, 2013; Gaetano et al., 2016; Larsson et al., 2017). Os efeitos benéficos à saúde cardiovascular descrita na literatura sugerem que a ingestão leve a moderada de etanol pode aumentar a sensibilidade à insulina, elevar a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzir a inflamação, aumentar a adiponectina e atuar como agente antitrombótico (Di Castelnuovo et al., 2009; O'Keefe et al., 2014). Os mecanismos propostos que podem explicar o aumento a

sensibilidade à insulina são a inibição da gliconeogênese, elevação dos níveis de adiponectina, aumento da síntese de insulina pelo pâncreas e supressão da metabolização de ácidos graxos do tecido adiposo (Hong et al., 2009; O’Keefe et al., 2014). O aumento da HDL, conhecido popularmente como colesterol bom, tem como principal função transportar o colesterol dos tecidos até o fígado para ser metabolizado, desde modo o aumento dessa lipoproteína apresenta importante papel na diminuição do risco de doença cardiovascular (Lima e Couto, 2006). Com relação à redução da inflamação, sugere-se que o etanol contribui para à diminuição da proteína C reativa, a qual se eleva no sangue quando há algum processo inflamatório em decurso no organismo (Di Castelnuovo et al., 2009). A adiponectina é um hormônio que apresenta importante papel na homeostase do organismo, pois aumenta a sensibilidade à insulina e apresenta propriedades anti-inflamatórias e anti-aterogênicas (Lima e Couto, 2006), sendo assim um fator de proteção contra doenças cardiovasculares. Por fim, o etanol diminui a agregação plaquetária e os níveis de fibrinogênio, os quais estão diretamente relacionados com doenças coronarianas (Gaetano et al., 2016).

3.5.2. Compostos fenólicos

Na cerveja a presença de compostos fenólicos pode estar relacionado aos efeitos benéficos associados ao seu consumo (Bamforth et al., 2002; Rimbau et al., 2014; Gaetano et al., 2016). Estudos têm demonstrado evidências de que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Vinson et al., 2003; Wang et al., 2014; Maietti et al., 2017). Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante devido a sua capacidade de doar elétrons, hidrogênio ou formar adutos com espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (Valko et al., 2007; Karabín, 2015; Gaetano et al., 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados normalmente durante o desenvolvimento das plantas e em situações de estresse, como doenças e exposição à radiação UV. Assim, estão naturalmente presentes nas plantas e nos alimentos e bebidas produzidas a partir delas, como a cerveja (Nacz

& Shahidi, 2004). Esses compostos contribuem para o sabor, o aroma e a cor, e ainda podem atuar como antioxidantes diminuindo a oxidação de outros compostos relacionados com aroma e sabor presentes na cerveja (Aron & Shellhammer, 2010; Tribaldo, 2015). Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes por meio de dois mecanismos principais, nomeadamente: (1) capacidade de quelar íons de metais de transição; (2) capacidade de desativar radicais através da doação de hidrogênio ou elétron. Nesse último mecanismo é gerado um radical fenoxil que é estabilizado por ressonância do anel aromático (Vanderhaegen et al., 2006). Genericamente, os compostos fenólicos apresentam um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais substituintes hidroxílicos. Nos alimentos e nas bebidas fermentadas, podem formar complexos conjugados com açúcares e compostos orgânicos (Naczki & Shahidi, 2004).

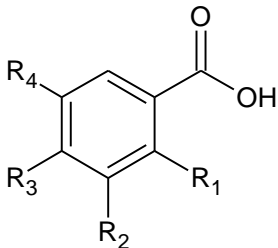
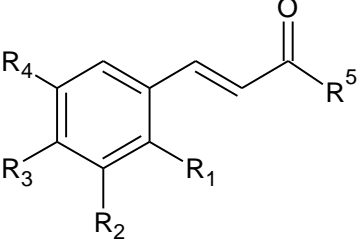
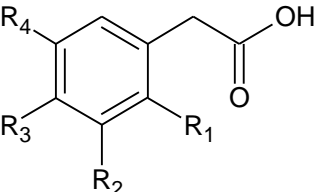
Na cerveja, os compostos fenólicos são principalmente provenientes da cevada e em menor proporção do lúpulo, visto que a quantidade de malte utilizado na fabricação da cerveja é mais elevada que a quantidade de lúpulo. (Eßlinger, 2009). As classes de fenólicos que já foram identificados em cerveja são ácidos fenólicos, flavonóides, prenilflavonóides, α -ácidos e β -ácidos (Intelmann et al., 2009; Callemien & Collin, 2010; Rada-Quifer et al., 2015; Heuberger et al., 2016).

Os ácidos fenólicos presentes na cerveja são derivados do malte e do lúpulo (Callemien & Collin, 2010). Eles apresentam na sua estrutura química um anel aromático, um substituinte carboxílico, uma ou mais hidroxilas e em algumas moléculas pode haver um ou mais grupos metoxila (Naczki & Shahidi, 2004). Essa classe de compostos se divide em três grupos, os ácidos hidroxibenzoicos e derivados, os ácidos hidroxicinâmicos e derivados e ácidos hidroxifenilacéticos (Rada-Quifer et al., 2015). Embora, apresentem um esqueleto carbônico muito similar, as posições das hidroxilas e das metoxilas no anel aromático variam bastante, originando diversos compostos diferentes (Callemien & Collin, 2010) (Tabela 2).

Os compostos da classe dos ácidos fenólicos podem desempenhar um papel benéfico à saúde, pois apresentam atividade antioxidante (Kondo, 2004; Aron & Shellhammer, 2010; Hung, 2014; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Também já foi reportado que o ácido cafeico e o ácido clorogênico, atuam na microbiota intestinal

inibindo e/ou reduzindo a multiplicação de *Bacteroides*, com consequente aumento de *Bifidobacterium*, bactérias associadas a uma menor concentração de proteína C-reativa no sangue, conferindo posteriormente uma possível proteção cardiovascular (Valdés et al.,2015). Na cerveja os ácidos fenólicos podem contribuir com as características sensoriais de adstringência e/ou amargor, além de auxiliar na proteção contra reações oxidativas (Callemien & Collin, 2010).

Tabela 2. Estrutura química dos ácidos fenólicos.

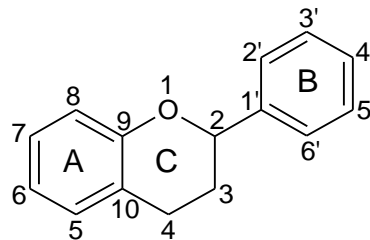
Ácidos fenólicos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Composto
Ácidos Hidroxibenzóicos						
	H	H	OH	H		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	H	OH	OH	OH		Ácido gálico
	H	OH	OH	OH		Ácido protocatecuico
	H	OCH ₃	OH	H		Ácido vanílico
Ácidos Hidroxicinâmicos						
	H	H	OH	H	OH	Ácido <i>p</i> -cumárico
	H	H	OH	H	OH	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico
	H	H	OH	OH	OH	Ácido caféico
	H	H	OH	OH	OH	Ácido cafeoilquínico
	H	H	OH	OCH ₃	OH	Ácido ferúlico
	H	H	OH	OCH ₃	OH	Ácido feruloilquínico
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	Ácido sináptico
Ácidos Hidroxifenilacéticos						
	H	H	OH	H		Ácido 4-hidroxifenilacético
	H	OH	H	H		Ácido 3-hidroxifenilacético
	OH	H	H	H		Ácido 2-hidroxifenilacético
	H	H	OH	OCH ₃		Homovanílico

Fonte: própria autora.

O malte e o lúpulo apresentam, também, diversos flavonoides que se mantêm inalterados até o processamento final da cerveja. Os flavonoides contêm dois anéis aromáticos (anéis A e B) conectados por três átomos de carbono centrais que formam um heterocíclico (anel C) (Figura 4). Diferentes substituições no anel C dão origem a diversas classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas e antocianidinas (Tabela 3). Os grupos funcionais, como hidroxilas e metoxilas, estão presentes em diferentes posições nos anéis A e B, o que propicia uma grande variedade de moléculas em cada uma das classes dos flavonoides. Ainda, muitas vezes os flavonoides podem estar mono, di ou triglicosilados, por exemplo, ligados a

moléculas como rhamnose, rutinose e glicose (Naczk & Shahidi, 2004; Callemien & Collin, 2010; Kong, 2011).

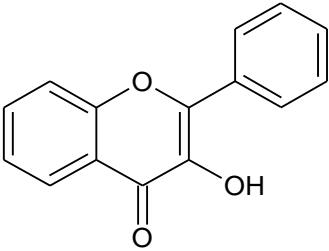
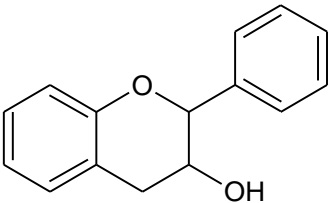
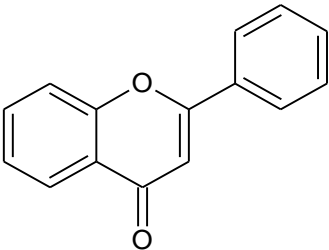
Figura 4. Estrutura química básica dos flavonoides.

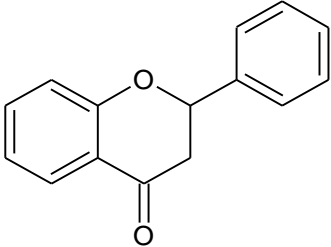
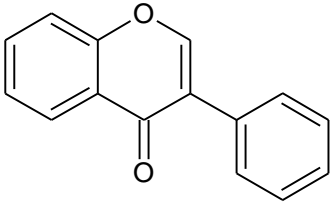
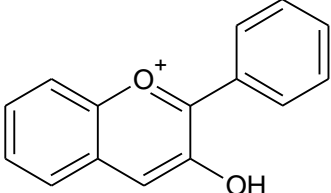


Fonte: própria autora.

Tabela 3. Estrutura química das diferentes classes dos flavonoides.

(continua)

Flavonoide	Substituição	Composto
Flavonol 	3,5,7,3',4' – OH 3,5,7,4' – OH 5,7,3',4' – OH; 3 – rutinose	Quercetina Kaempferol Rutina
Flavanol 	3,5,7,3',4' – OH 3,5,7,3',4' – OH 5,7,3',4' – OH; 3 – O-glicosídeo	Catequina Epicatequina Catequina 3-O-glicosídeo
Flavona 	5,7,4' – OH	Apigenina

Flavanona		
	5,4' – OH; 7- rhamnoglucose	Naringina
	3,5,3' – OH; 4 – OCH ₃ ; 7 - rutinose	Hesperidina
	5,7,4' – OH	Naringenina
	3,5,7,3',4' – OH	Taxifolin
Isoflavona		
	5,7,4' – OH	Genisteina
Antocianidinas		
	3,5,7,3',4' – OH	Cianidina

Fonte: própria autora.

A atividade biológica dos flavonoides depende da relação entre as estruturas químicas e as orientações dos grupos funcionais de cada classe desses compostos. Há diversas evidências por meio de estudos epidemiológicos que os flavonoides são compostos que apresentam atividade antioxidante, capacidade de inibir a proliferação celular e atividade antiestrogênica (Ross & Kasum, 2002; Vinson et al, 2003; Kondo, 2004; Rice-Evans, 2006). Ainda, os flavonoides previnem a progressão de aterosclerose e doenças como hipercolesterolemia e hipertensão que podem levar a doenças cardiovasculares (Vinson et al, 2003; Macready et al., 2014; Karabín, 2015). Na cerveja esses compostos também atuam como antioxidantes, reagindo com radicais livres e quelando íons de metais de transição (Vanderhaegen, 2006). Adicionalmente, os flavonoides contribuem com a turbidez causada por proteínas da cevada, devido à alta afinidade dos flavonoides com essas proteínas. A

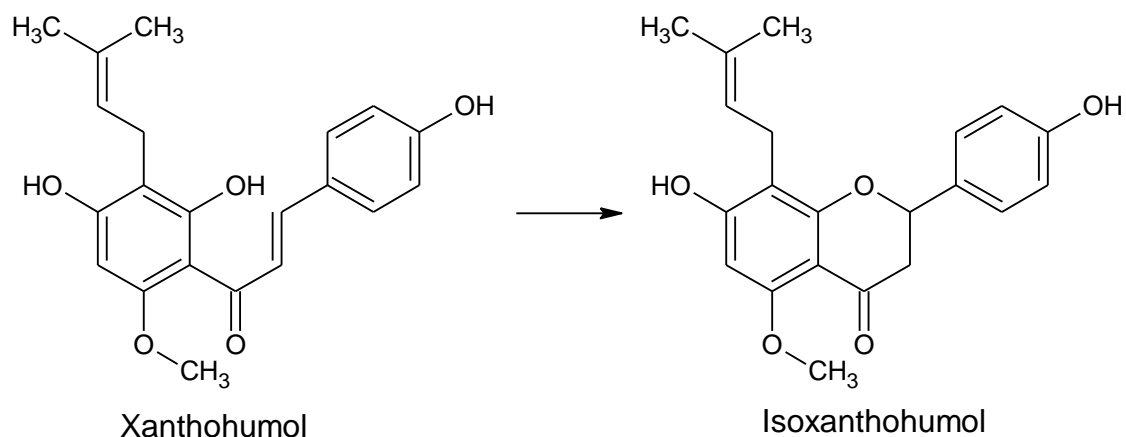
presença desses complexos insolúveis de proteínas e flavonoides confere sensação sensorial adstringente à cerveja, sendo, muitas vezes necessária a estabilização coloidal por meio de armazenamento prolongado à frio, filtração à frio, clarificação com gelatina ou ácido tânico, adição de enzimas proteolíticas ou tratamentos com adsorventes, como polivinilpirrolidona. Portanto, a remoção desses complexos pode impactar na qualidade sensorial e na estabilidade do sabor da cerveja, devido à capacidade antioxidante já citada dos flavonoides. Finalmente, flavanóis como catequina, epicatequina e compostos derivados dessa classe de flavonoides, podem auxiliar no sabor amargo da cerveja (Aron & Shellhammer, 2010; Heuberger et al., 2016).

Os prenilflavonoides fazem parte do grupo dos flavonoides, pertencendo a um subgrupo das chalconas (moléculas precursoras dos flavonoides) ou das flavanonas. O xanthohumol é o principal representante dos prenilflavonoides e está presente em grandes quantidades nas glândulas de lupulina do lúpulo (Stevens & Page, 2004). No entanto, na cerveja, o xanthohumol está presente em baixa concentração, pois é pouco hidrossolúvel. Durante o processo de fabricação da cerveja o xanthohumol é isomerizado a um composto mais solúvel, o isoxanthohumol, como é apresentado na **Figura 5** (Roberts & Wilson, 2006). Aproximadamente 15 a 50% do xanthohumol presente no lúpulo permanece inalterado até o final do processo de produção de cerveja. Diferentemente dos outros compostos do grupo dos flavonoides, muitos prenilflavonoides apresentam os substituintes prenil e geranil (Callemien & Collin, 2010; Karabín, 2015) (Tabela 4).

Alguns trabalhos da literatura relataram que compostos como o xanthohumol, o isoxanthohumol e o 8-prenilnaringenina apresentam atividade estrogênica. Este último apresenta uma atividade muito maior que os demais sendo este o fitoestrógeno com maior atividade estrogênica encontrado na natureza. Alguns estudos indicam que isoxanthohumol seria desmetilado por algumas bactérias do intestino sendo transformado em 8-prenilnaringenina, dessa forma a concentração sanguínea desse composto seria aumentada (Stevens & Page, 2004; Possemiers et al., 2008; Roberts & Wilson, 2006; Yao et al., 2015). Esses compostos também podem prevenir a osteoporose, prevenir distúrbios neurodegenerativos, atuar como agentes quimiopreventivo contra câncer, como agentes antioxidantes e como agentes antimicrobianos (Kondo, 2004; Briggs et al., 2004; Karabín, 2015; Yao et al.,

2015; Żołnierczyk et al., 2015). Em estudo realizado com enriquecimento com xanthohumol em cerveja produzidas com diferentes tipos de malte, demonstrou-se que concentrações de até 2 mg.L⁻¹ (p/v) de xanthohumol aumentaram a estabilidade oxidativa da cerveja. Nesse mesmo trabalho, também foi avaliado se o enriquecimento com xanthohumol afetaria a viabilidade celular das leveduras. Os resultados mostram que em pequenas concentrações de xanthohumol (até 5 mg.L⁻¹) (p/v), ocorreu uma maior multiplicação celular, menor oxidação intracelular e menos danos ao DNA da levedura (Carvalho, 2016).

Figura 5. Isomerização do xanthohumol em isoxanthohumol.



Fonte: própria autora.

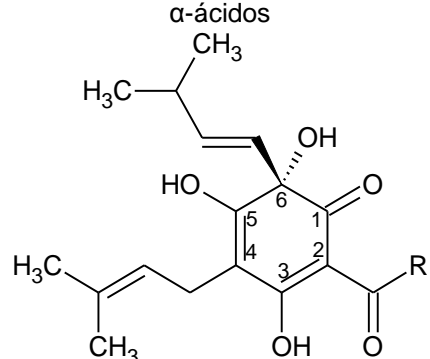
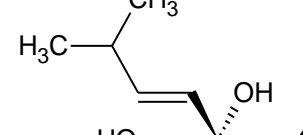
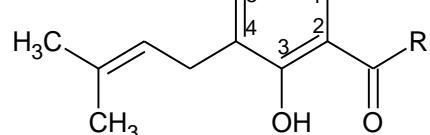
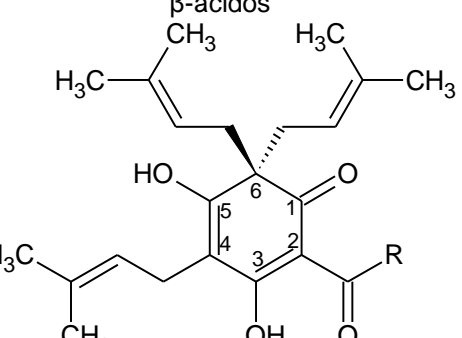
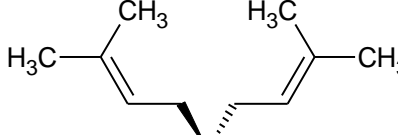
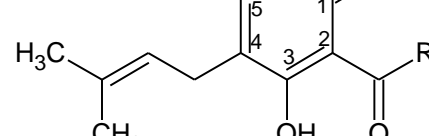
Tabela 4. Estrutura química dos prenilflavonoides.

Estrutura dos prenilflavonoides	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Composto
Derivados das chalconas					
	OH	H	OH	Prenil	Desmetilxanthohumol
	OH	H	OH	Geranil	3'- Geranilchalconaringenina
	OH	Prenil	OH	Prenil	3',5'- Diprenilchalconaringenina
Derivados das flavanonas					
	OH	H	OH	H	Naringenina
	OH	Prenil	OH	H	6-Prenilnaringenina
	OH	H	OH	Prenil	8-Prenilnaringenina
	OH	Geranil	OH	H	6-Geranilnaringenina

Fonte: própria autora.

Os α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) são compostos presentes na cerveja que são provenientes do lúpulo (Tabela 5). As duas classes se diferem pelos substituintes presentes na posição 6 do anel aromático, sendo que nos α -ácidos, os substituintes são uma hidroxila e um grupo prenil e nos β -ácidos os substituintes são dois grupos prenil. Tanto as humulonas quanto as lupulonas apresentam atividade antibacteriana que é atribuída aos grupos prenil presentes em todas as moléculas das duas classes (Keukeleire, 2000; Caballero et al., 2012).

Tabela 5. Estrutura química dos ácidos amargos.

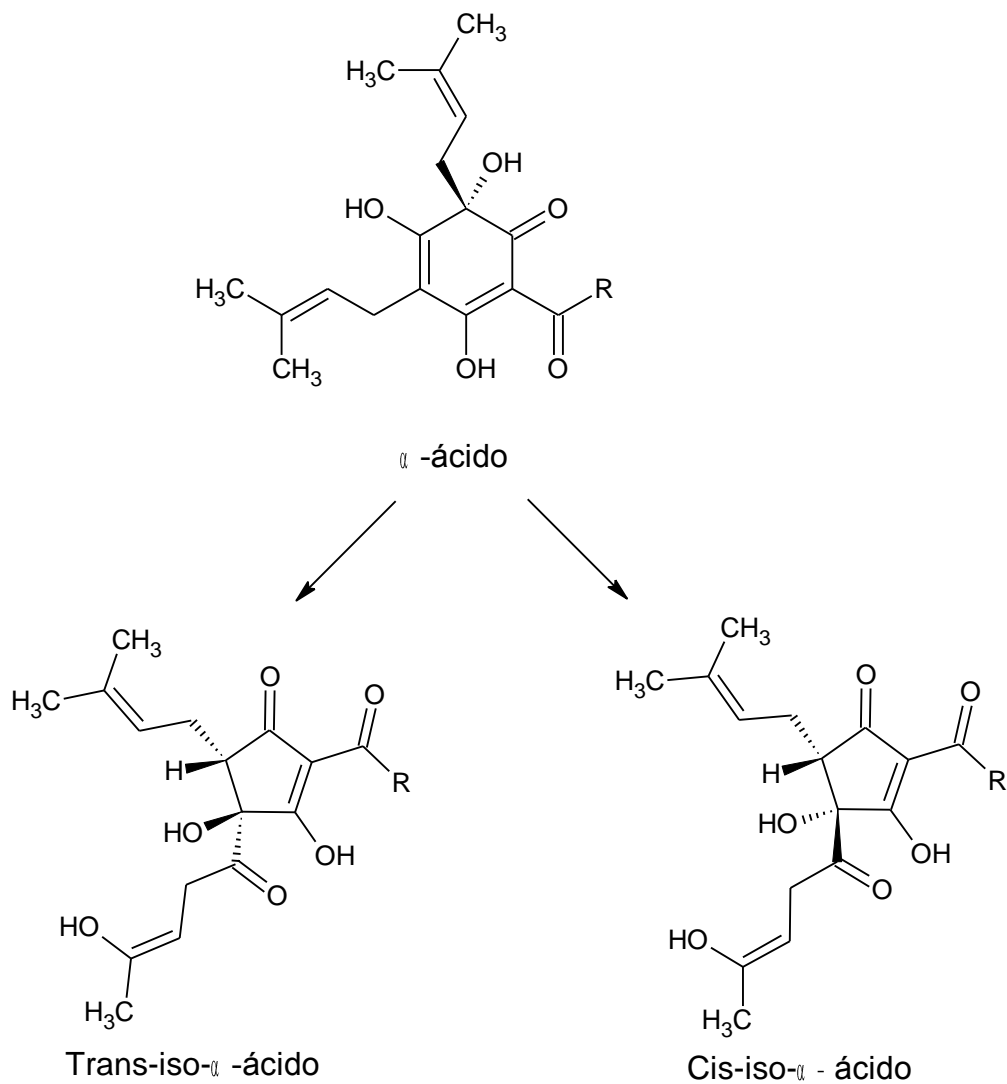
Ácidos amargos	R	Composto
 <p>α-ácidos</p>	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Humolona
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Cohumulona
	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	Adhumulona
 <p>β-ácidos</p>	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Lupulona
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Colupulona
	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	Adlupulona

Fonte: própria autora.

Durante a fervura do mosto cervejeiro ocorre uma importante mudança conformacional de algumas moléculas: a isomerização térmica dos α -ácidos em iso- α -ácidos (Figura 6). Cada um dos α -ácidos origina dois isômeros, cis e trans, sendo que a proporção normalmente é de 68:32 (cis:trans). Acredita-se que isso ocorra, pois o isômero cis é mais estável quimicamente que o isômero trans (Keukeleire, 2000). Contudo, apenas cerca de 50% α -ácidos são isomerizados, e

aproximadamente 25% dos iso- α -ácidos não são degradados durante o processo de fabricação da cerveja (Bamforth, 2000). Os iso- α -ácidos são compostos mais amargos e mais hidrossolúveis do que as moléculas precursoras, sendo os principais compostos responsáveis pelo amargor da cerveja (Verzele, 1986; Vanderhaegen et al, 2006; Intelmann et al., 2009). Além dessas duas características, os iso- α -ácidos ainda auxiliam na estabilização da espuma da cerveja e também apresentam atividade antibacteriana (Caballero et al., 2012).

Figura 6. Isomerização de α -ácido em iso- α -ácido.

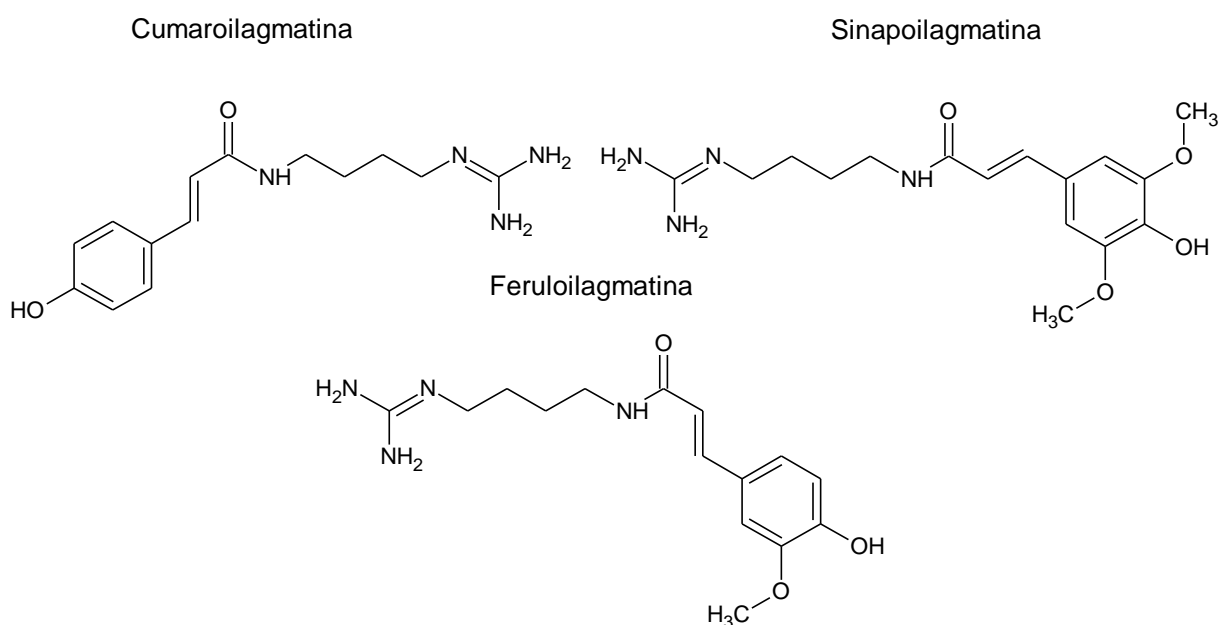


Fonte: própria autora.

3.5.1. Compostos nitrogenados

Recentemente foram identificadas em cerveja algumas classes de compostos nitrogenados provenientes da cevada, do milho, do trigo e do centeio, como fenolamidas e benzoxazinoides (Pihlava, 2014; Pihlava & Kurtelius, 2016). Dentro da classe das fenolamidas pode-se citar as agmatinas (Figura 7), metabolitos secundários produzidos em resposta ao estresse causado por patógenos e condições ambientais desfavoráveis (Facchini, et al., 2002). As agmatinas ligadas a ácidos hidroxicinâmicos são produtos da ligação covalente entre o grupo carboxílico de ácidos hidroxicinâmicos e agmatina (Pihlava, 2014).

Figura 7. Estrutura química de agmatinas ligadas a ácidos hidroxicinâmicos.

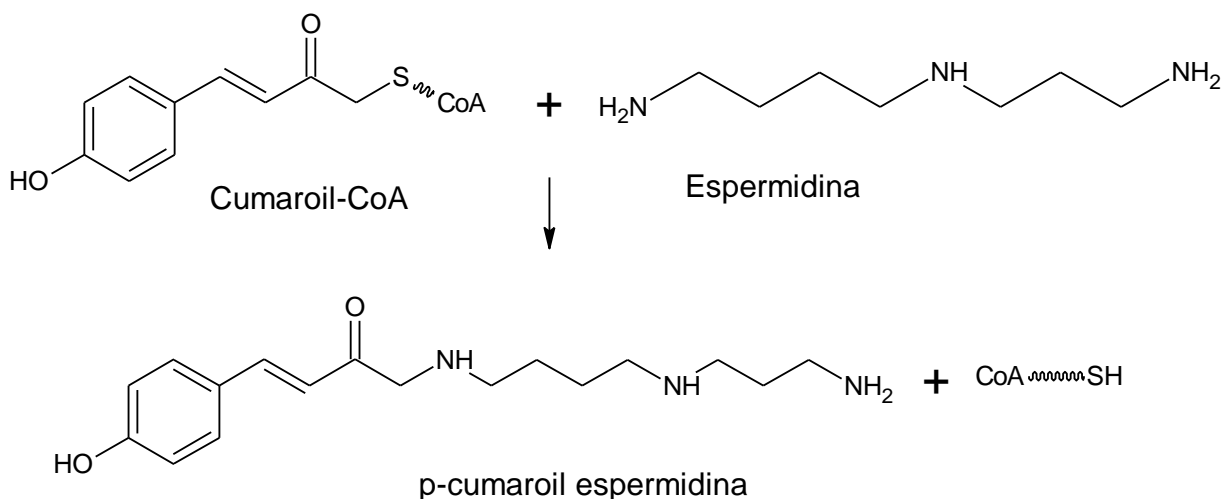


Fonte: própria autora.

As amidas de ácido hidroxicinâmico também são compostos da classe das fenolamidas que podem estar presentes na cerveja. Como exemplo, pode-se citar o feruloilputrescina, o cumaroilespermidina, o cafeiolespermidina, o feruloil espermidina e o cafeoilferuloil espermidina (Pihlava, 2014). Esses compostos são produtos da ligação covalente entre o grupo carboxílico de ácidos hidroxicinâmicos e cadeias de poliaminas alifáticas, como espermidina, espermina e putrescina (Figura

8). Assim como as agmatinas ligadas a ácidos hidroxicinâmicos as amidas de ácido hidroxicinâmico são metabólitos secundários produzidos naturalmente pelas plantas durante o seu desenvolvimento e em situações de estresse (Edreva et al., 2007).

Figura 8. Reação entre cumaroil-CoA e espermidina, catalisada pela enzima espermidina hidroxicinamoil transferase, dando origem a p-cumaroil espermidina.



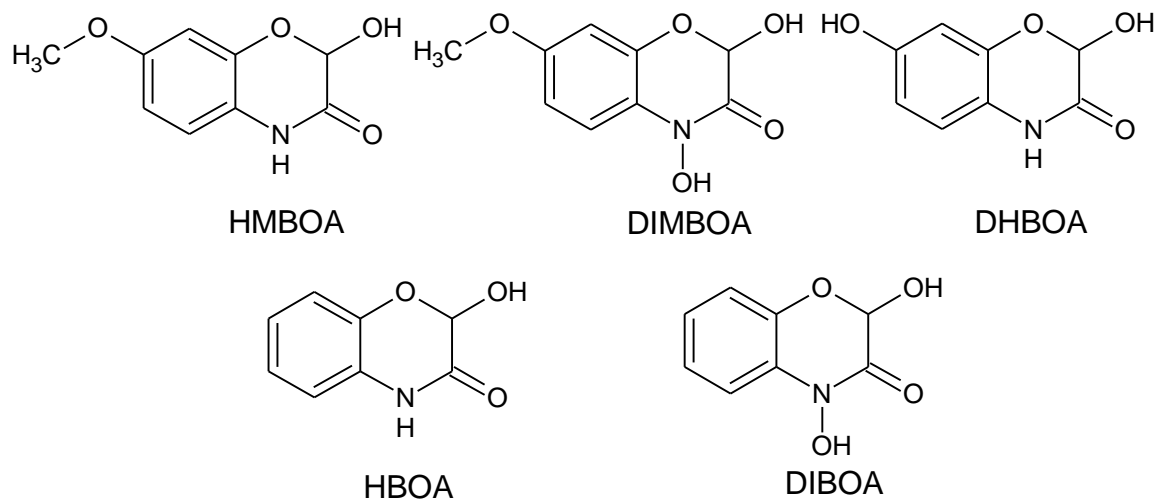
Fonte: própria autora.

Os benzoxazinoides são fitoanticipinas constitutivas, ou seja, são metabólitos secundários produzidos por espécies de plantas da família Poaceae (*Gramineae*), como cevada, milho, trigo e centeio, antes do ataque de patógenos (Frey et al., 2009; Ahmad et al., 2011). Como essas espécies de plantas são utilizadas na fabricação de cerveja, os benzoxazinoides podem estar presentes nessa bebida (Pihlava & Kurtelius, 2016). Esses compostos apresentam um anel aromático conjugado com heterociclo dissustituído, como é ilustrado na **Figura 9** (Sicker et al., 2000).

Os produtos finais da biossíntese dos benzoxazinoides são compostos glicosilados, pois a glicosilação diminui a toxicidade dessas moléculas para as células das plantas. Entretanto, quando as células são rompidas por ataques de patógenos ou de animais os benzoxazinoides glicosilados são convertidos às suas formas agliconas (Frey et al., 2009). Os possíveis mecanismos de ação descritos sugerem que compostos como DIBOA reagiriam com grupos nucleofílicos NH₂ e SH de biomoléculas presentes em bactérias, fungos e insetos. Mais detalhadamente, os benzoxazinoides atuariam reduzindo o transporte de elétrons nas mitocôndrias e nos

cloroplastos e reduzindo a atividade da glutationa S-transferase (enzima antioxidante), por exemplo (Sicker et al., 2000).

Figura 9. Estrutura química dos benzoxazinoides.



Fonte: própria autora.

Nota: HMBOA (2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona), DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona), DHBOA (2,7-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona), HBOA (2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona) e DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produtos químicos e padrões

Os seguintes solventes e reagentes foram utilizados: acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), ácido fórmico P.A. (Merck), ácido clorídrico 6M (Neon), iso-octano grau HPLC e espectrometria UV (Vetec) e ácido acético glacial (Neon). A água utilizada foi água ultrapura (Milli-Q) produzida por um sistema Millipore. Os padrões de ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, catequina, epicatequina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoxanthohumol, kaempferol, quercetina anidra e quercetina-3-O-glicosídeo (pureza 97-99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.2. Amostragem

Três estilos de cervejas artesanais foram analisados neste estudo, nomeadamente: India Pale Ale (IPA), Pilsen e Weiss. As amostras foram obtidas por doação de cervejarias artesanais ou por compra em supermercados da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Ainda, foi analisada uma cerveja não artesanal do estilo American Lager, sendo obtida por meio de compra em supermercado. Os nomes das empresas foram omitidos e as amostras estão apresentadas por códigos. Três garrafas de três lotes de produção foram adquiridas para cada um dos três estilos de cerveja (Tabela 6).

A escolha dos estilos de cervejas que seriam avaliados nesse trabalho foi definida após a realização de pesquisa de comercialização de cervejas artesanais na região de Porto Alegre. Para isso, entrou-se em contato via telefone ou por visita às indústrias e distribuidoras de cervejas artesanais.

O conteúdo das garrafas foi homogeneizado, desgaseificado em ultrassom e filtrado em filtro de papel filtro qualitativo. As amostras foram congeladas em tubos de polipropileno por imersão nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análises posteriores.

Tabela 6. Estilo, código do lote e informações descritas no rótulo das cervejas analisadas.

Estilo de cerveja	Código do lote (contendo três garrafas)	Cor ^b	Teor alcoólico ^b (%,v/v)
IPA	MJ1	Clara	4,5
IPA	MJ2	Clara	4,5
IPA	MJ3	Clara	4,5
IPA	FI1	Escura	6,5
IPA	FI2	Escura	6,5
IPA	FI3	Escura	6,5
IPA	TI1	Clara	8,6
IPA	TI2	Clara	8,6
IPA	TI3	Clara	8,6
Pilsen	DP1	n.d.	5
Pilsen	DP2	n.d.	5
Pilsen	DP3	n.d.	5
Pilsen	FP1	Clara	4,5
Pilsen	FP2	Clara	4,5
Pilsen	FP3	Clara	4,5
Pilsen	TP1	Clara	5
Pilsen	TP2	Clara	5
Pilsen	TP3	Clara	5
American Lager	CP1 ^a	n.d.	4,7
American Lager	CP2 ^a	n.d.	4,7
American Lager	CP3 ^a	n.d.	4,7
Weiss	DW1	n.d.	5
Weiss	DW2	n.d.	5
Weiss	DW3	n.d.	5
Weiss	FW1	Clara	5
Weiss	FW2	Clara	5
Weiss	FW3	Clara	5
Weiss	TW1	Clara	5,3
Weiss	TW2	Clara	5,3
Weiss	TW3	Clara	5,3

Nota: ^aCerveja não artesanal; ^bDescrições do rótulo. n.d. = não descrito no rótulo.

Devido uma das empresas não pasteurizar as amostras de cerveja do estilo IPA, realizou-se a pasteurização conforme o dossiê técnico do SBRT (Serviço Brasileiro de Resposta Técnicas), com ligeiras modificações. As garrafas foram colocadas em um recipiente metálico, aquecidas até 60°C e mantidas por 20 min dentro do recipiente fechado com tampa. A seguir, as garrafas foram resfriadas com água corrente até temperatura ambiente (~ 27°C).

4.3. Características físico-químicas

4.3.1. Cor

A cor foi avaliada conforme método descrito por Spearot (2016) com algumas modificações. Brevemente, após desgaseificação a amostra foi centrifugada a 3000 g por 5 min e o sobrenadante foi recolhido e diluído em água ultrapura. A absorvância a 430 nm da solução diluída foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu UV Spectrophotometer UV1800) em cubeta de quartzo de 10 mm contra um branco de água ultrapura. Os resultados foram expressos em EBC (*European Brewery Convention*) utilizando a seguinte fórmula: $EBC = 25 \times \text{fator de diluição} \times Abs_{430nm}$.

4.3.2. Amargor

O amargor foi avaliado utilizando o método definido pela EBC (2004) de extração com iso-octano, com pequenas modificações. Após sonicação, 2,5 mL de cada amostra foram acidificados com 125 μ L de HCl 6 M e foram adicionados 5 mL de iso-octano. A seguir, a amostra foi agitada em agitador de rolos a 100 rpm por 15min a 20°C e centrifugada a 3000 g por 3 min. A absorvância da camada de iso-octano foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu UV Spectrophotometer UV1800) em cubeta de quartzo de 10 mm contra um branco de isooctano. Os resultados foram expressos em IBU (International Bitterness Units) utilizando a fórmula $IBU = 50 \times Abs_{275nm}$.

4.3.3. Grau Alcoólico e Extrato Primitivo

A determinação do grau alcoólico e do extrato primitivo foram realizados em densímetro eletrônico acoplado a espectrômetro NIR (Near Infra-red) (Alcolyzer Beer) no Laboratório de Análises Agropecuárias do Rio Grande do Sul (LANAGRO-

RS). Os resultados do grau alcoólico e do extrato primitivo serão expressos em porcentagem de etanol e graus Plato, respectivamente.

4.3.4. Análise Estatística

Os dados das análises físico-químicas relativos a cor, amargor, teor alcoólico e extrato primitivo foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator e complementadas pelo teste de Tukey, com 95% de confiabilidade, utilizando o programa Microsoft Excel 2007 com a biblioteca Real Statistics¹.

4.4. Determinação de compostos fenólicos e nitrogenados

4.4.1. Semi-purificação para análise em HLPC-DAD-ESI-MS/MS

Previamente às análises dos compostos fenólicos e nitrogenados, as amostras de cerveja foram purificadas por extração em fase sólida (SPE) utilizando o método de Rada-Quifer e colaboradores (2015) com pequenas modificações. Inicialmente, as amostras foram descongeladas e o etanol foi evaporado em evaporador rotatório. Os cartuchos de SPE Oasis[®] MAX 30 mg foram ativados com 1 mL de metanol e condicionados com 1 mL de solução de acetato de sódio (50 mM, pH 7). A seguir, foram adicionados 2 mL de cerveja desalcoholizada e acidificada com 34 µL de ácido clorídrico (38%). Os cartuchos foram lavados com 1 mL de solução de acetato de sódio (50 mM, pH 7) contendo 5% de metanol com o objetivo de remover compostos interferentes, tais como açúcares e outras moléculas de elevada massa molecular. Os compostos fenólicos e nitrogenados foram eluídos com 1800 µL de metanol acidificado com 2% de ácido fórmico em frasco âmbar e armazenados a -20°C até a injeção no sistema de cromatografia de alta eficiência

¹ Disponível no site <<http://www.real-statistics.com/>>

com detector de rearrajo de diodos acoplado a espectrômetro de massas contendo uma fonte de ionização *electrospray* (HPLC-DAD-ESI-MS/MS).

Previamente à injeção no HPLC-DAD-ESI-MS/MS, as amostras foram secas em evaporador rotatório e o extrato seco obtido foi reconstituído com 1 mL de água acidificada (0,5% de ácido fórmico) e filtrado em membrana de acetato de celulose de diâmetro 0,22 μm .

Anteriormente a aplicação da SPE foi realizado um ensaio prévio para estimar a recuperação de quatro compostos fenólicos de diferentes classes em cartuchos Oasis[®] MAX. Para isso, adicionou-se uma concentração conhecida dos padrões de ácido gálico (24 mg.L^{-1}), ácido cumárico (12 mg.L^{-1}), catequina (45 mg.L^{-1}) e rutina (18 mg.L^{-1}) a uma amostra de cerveja. As recuperações e os desvios padrões dos compostos fenólicos foram as seguintes: ácido gálico 66% \pm 8, ácido cumárico 93% \pm 8, catequina 62% \pm 12 e rutina 113% \pm 5.

4.4.2. Determinação dos compostos fenólicos e nitrogenados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

A determinação dos compostos fenólicos e nitrogenados foi realizada em HPLC da Shimadzu (Quioto, Japão) contendo duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A, injetor automático SIL20AHT, detector de rearranjo de diodos SPD-M20A (DAD) e forno CTO-20A conectado em série a um espectrômetro de massas (MS) da Bruker Daltonics (micrOTOF-Q II, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização *electrospray* (ESI). Os compostos fenólicos e nitrogenados foram separados em uma coluna Synergi C18 (4 μm , 250 x 4,6 mm) com um fluxo de 0,7 mL.min^{-1} a 29 °C, com fase móvel consistindo de água: ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (solvente B) em gradiente linear (Rodrigues et al., 2013). Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 280, 320 e 360 nm. O eluato da coluna foi dividido de forma que apenas 0,35 mL.min^{-1} entrou na interface ESI. Os espectros de massas foram adquiridos com um *scan range* de m/z 100 a 800. Os parâmetros do MS foram

os seguintes: fonte ESI nos modos de ionização positivo e negativo; voltagem do capilar: 2000 V; *end plate offset*: -500 V; saída do capilar: -110 V; temperatura e fluxo do gás de secagem 310 °C e fluxo: 8 L.min⁻¹; pressão do gás nebulizador: 30 psi; o MS² foi realizado no modo automático com a energia de fragmentação variando de 35 a 50 eV. Os compostos fenólicos foram identificados considerando os seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna C₁₈, características espectrais do UV-vis - comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), comparação com padrões analíticos, comparação com as características espectrais de MS dos padrões analíticos analisados nas mesmas condições. O tempo de retenção, o UV-vis e os dados do espectro de massas de 13 padrões de compostos fenólicos foram usados para confirmar a presença ou ausência dos compostos fenólicos presentes nas amostras (Apendice C - Tabela S1). Os compostos fenólicos e nitrogenados que foram tentativamente identificados consideraram-se os parâmetros de ordem de eluição em coluna C₁₈, características espectrais do UV-vis — comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) — e dados massa exata e características espectrais de MS disponíveis na literatura (Clifford et al., 2003; Ferreres et al., 2003; Mullen et al., 2003; Del Rio et al., 2004; Bravo et al., 2006; Dou et al., 2007; Gardana et al., 2007; Sun et al., 2007; Bonaccorsi et al., 2008; Gruz et al., 2008 ; Ceslová et al., 2009; Liu et al., 2009; Pawlowska et al., 2009; Svensson et al., 2010; Roowi e Crozier, 2011; Zimmermann et al., 2011; Farag et al., 2012; Rockenbach et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Brito et al., 2014; Pihlava, 2014; Carvalho et al., 2015; Coutinho et al., 2015; Dong et al., 2015; Rada-Quifer et al., 2015; Spínola et al., 2015; Ambigaipalan et al., 2016; Bruijn et al., 2016; Pihlava & Kurtelius, 2016; Sisó-Terraza et al., 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características físico-químicas

As características de cor, amargor, teor alcoólico e extrato primitivo foram analisadas estatisticamente conforme descrito na Seção 4 item 4.4. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão (n=3) das análises de cor, amargor, teor alcoólico e extrato primitivo em cervejas artesanais.

(continua)

Estilo	Amostra	Cor (EBC)	Amargor (IBU)	Teor alcoólico (% v/v)	Ext. primitivo (°Plato)
IPA	MJ1	10 ^a ± 0,05	56 ^a ± 3,92	4,9 ^a ± 0,04	12 ^a ± 0,08
IPA	MJ2	12 ^b ± 0,24	52 ^a ± 0,08	4,3 ^b ± 0,18	11 ^b ± 0,27
IPA	MJ3	12 ^b ± 0,06	45 ^b ± 0,80	5,2 ^c ± 0,01	12 ^c ± 0,03
IPA	MJ (média)	11 ^B	51 ^A	4,8 ^B	12 ^B
IPA	FI1	50 ^a ± 0,86	56 ^a ± 1,36	5,7 ^a ± 0,4	13 ^a ± 0,08
IPA	FI2	23 ^b ± 0,37	58 ^a ± 2,28	6,8 ^b ± 0,55	15 ^b ± 0,23
IPA	FI3	25 ^b ± 0,06	54 ^a ± 2,62	6,2 ^c ± 0,06	15 ^b ± 0,09
IPA	FI (média)	33 ^A	56 ^A	6,2 ^A	14 ^A
IPA	TI1	15 ^a ± 0,10	56 ^a ± 0,71	5,0 ^a ± 0,06	12 ^a ± 0,12
IPA	TI2	17 ^b ± 0,09	63 ^b ± 0,72	6,7 ^b ± 0,02	14 ^b ± 0,03
IPA	TI3	18 ^c ± 0,11	73 ^c ± 2,82	7,2 ^c ± 0,03	11 ^c ± 0,06
IPA	TI (média)	17 ^B	64 ^B	6,3 ^A	12 ^B

(continuação)

Pilsen	DP1	14 ^a ± 0,06	35 ^a ± 0,60	5,4 ^a ± 0,10	13 ^a ± 0,20
Pilsen	DP2	11 ^b ± 0,02	31 ^b ± 0,45	5,2 ^b ± 0,02	12 ^b ± 0,07
Pilsen	DP3	9 ^c ± 0,04	38 ^c ± 2,06	5,3 ^b ± 0,02	13 ^a ± 0,04
Pilsen	DP (média)	11 ^A	35 ^B	5,3 ^B	13 ^B
Pilsen	FP1	12 ^a ± 0,08	20 ^a ± 0,49	4,9 ^a ± 0,10	11 ^a ± 0,19
Pilsen	FP2	11 ^a ± 0,26	22 ^b ± 0,65	5,5 ^b ± 0,02	11 ^b ± 0,08
Pilsen	FP3	12 ^a ± 0,05	18 ^c ± 0,18	4,7 ^c ± 0,08	11 ^a ± 0,06
Pilsen	FP (média)	11 ^A	20 ^A	5,0 ^A	11 ^A
Pilsen	TP1	13 ^a ± 0,07	15 ^a ± 0,67	5,6 ^a ± 0,01	13 ^a ± 0,11
Pilsen	TP2	13 ^b ± 0,07	18 ^b ± 0,48	5,1 ^b ± 0,05	13 ^b ± 0,04
Pilsen	TP 3	10 ^c ± 0,04	22 ^c ± 0,68	4,7 ^c ± 0,04	12 ^c ± 0,01
Pilsen	TP (média)	12 ^A	18 ^A	5,1 ^{A,B}	13 ^B
American Lager	CP1	5,4 ^a ± 0,05	6,5 ^a ± 0,29	4,3 ^a ± 0,05	10,38 ^a ± 0,12
American Lager	CP2	5,5 ^a ± 0,01	6,6 ^a ± 0,43	4,4 ^a ± 0,02	10,51 ^a ± 0,04
American Lager	CP3	5,6 ^a ± 0,06	6,9 ^a ± 0,37	4,2 ^a ± 0,00	10,45 ^b ± 0,00
American Lager	CP (média)	-	-	-	-

						(conclusão)
Weiss	DW1	14 ^a ± 0,02	11 ^a ± 0,34	4,7 ^a ± 0,37	11 ^a ± 0,61	
Weiss	DW2	14 ^b ± 0,05	12 ^b ± 0,35	4,9 ^a ± 0,05	11 ^a ± 0,09	
Weiss	DW3	13 ^c ± 0,02	14 ^c ± 0,25	4,9 ^a ± 0,07	11 ^a ± 0,14	
Weiss	DW (média)	14 ^A	12 ^A	4,8 ^{A,B}	11 ^A	
Weiss	FW1	18 ^a ± 0,23	15 ^a ± 0,70	5,4 ^a ± 0,15	12 ^a ± 0,26	
Weiss	FW2	11 ^b ± 0,04	19 ^b ± 0,05	5,1 ^b ± 0,03	11 ^b ± 0,07	
Weiss	FW3	10 ^b ± 0,15	7 ^c ± 0,22	4,6 ^c ± 0,14	11 ^c ± 0,21	
Weiss	FW (média)	13 ^A	14 ^A	5,0 ^A	11 ^A	
Weiss	TW1	10 ^a ± 0,05	9 ^a ± 0,13	4,1 ^a ± 0,08	11 ^a ± 0,23	
Weiss	TW2	9 ^b ± 0,09	10 ^b ± 0,09	5,2 ^b ± 0,06	13 ^b ± 0,14	
Weiss	TW3	11 ^c ± 0,03	16 ^c ± 0,43	4,7 ^c ± 0,16	13 ^b ± 0,23	
Weiss	TW (média)	10 ^B	12 ^A	4,7 ^B	12 ^B	

Notas: Ext. primitivo = extrato primitivo. Letras minúsculas representam se há ou não diferença estatística entre os lotes de cada estilo de cada empresa. Letras maiúsculas representam se há ou não diferença estatística entre mesmos estilos de cada empresa.

Em geral, os três estilos de cerveja artesanal estudados possuem diferença em relação a cor, amargor, teor alcoólico e extrato primitivo entre ao menos dois lotes de cada empresa (Tabela 7). Isso indica que frequentemente não há uma padronização na produção de cada lote das empresas analisadas. No entanto, a cerveja não artesanal (American Lager) não apresentou diferença estatística significativa entre cor, amargor e teor alcoólico, evidenciando uma melhor padronização dos lotes. Comparando as empresas que produzem o mesmo estilo de cerveja (Tabela 7), pode-se constatar que há diferença estatística na cor entre duas empresas dos estilos IPA e Weiss, no amargor entre duas empresas do estilo Pilsen, no teor alcoólico e no extrato primitivo entre duas empresas dos estilos IPA, Pilsen e Weiss. Esses dados mostram que mesmo entre as cervejas dos mesmos

estilos, normalmente, há diferenças entre a cor, amargor, teor alcoólico e/ou extrato primitivo entre diferentes empresas. A explicação para esse fato pode ser a utilização de matérias primas e métodos de produção diferentes em cada empresa.

Seguindo os parâmetros descritos no Decreto nº 6.871, todas as amostras apresentaram resultados da análise de cor compatíveis com os dados descritos nos rótulos (Tabela 6), mesmo ocorrendo discrepâncias entre alguns lotes da mesma empresa. Com relação ao teor alcoólico, apenas as amostras das empresas DP, CP, DW e FW apresentaram todos os lotes dentro do limite de tolerância de diferença (0,5%, v/v) do resultado obtido experimentalmente do valor descrito no rótulo. As demais cervejarias apresentaram ao menos um lote que ultrapassou o limite de tolerância, sendo que cervejaria TI obteve os resultados mais divergentes, nos quais todos os lotes excederam o limite de tolerância.

5.2. Determinação compostos de fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Um total de 57 compostos fenólicos foi identificado ou tentativamente identificado (Tabela 8), o que é similar ao número de compostos fenólicos encontrados por outros autores em cerveja (Callemien & Collin, 2010). Os espectros de massas dos compostos fenólicos estão presentes no Apêndice A. Na primeira parte deste trabalho será discutida a identificação dos compostos fenólicos e na segunda parte será discutida a possível origem dos compostos fenólicos que foram encontrados pela primeira vez em cerveja. Além disso, será discutida a importância desses compostos nas características sensoriais da cerveja e os possíveis benefícios à saúde associados à presença desses compostos.

Os compostos 1 e 9 foram tentativamente identificados como ácido dimetoxibenzóico I e II (MM = 182,0579). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 181,0533 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 163,0443 $[M-H-18]^-$, correspondendo à perda de uma molécula de água (H_2O), m/z 135,0481 $[M-H-18-28]^-$, correspondendo à perda de uma molécula de H_2O e monóxido de carbono (CO), e m/z 119,0532 $[M-H-18-44]^-$,

correspondendo à perda de uma molécula de H₂O e dióxido de carbono (CO₂). Esses dados são similares aos relatados na literatura (Zimmermann et al., 2011).

Os compostos 2, 4 a 6, 8 e 12 foram tentativamente identificados como derivados do ácido dihidroxibenzoico (MM = 154,0266). Esses compostos apresentaram massa exata similar à relatada na literatura (Rada-Quifer et al., 2015) e a ordem de eluição foi seguida conforme Liu e colaboradores (2009). No modo de ionização negativo o espectro de massas do ácido 2,4- dihidroxibenzoico, composto 8, mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 153,0219 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 109,0294 [M-H- 44]⁻, correspondendo a perda característica de CO₂, frequentemente relatada em compostos derivados do ácido hidroxibenzoico (Rada-Quifer et al., 2015).

As moléculas derivadas da (epi) catequina foram tentativamente identificadas como (epi) catequina hexosídeo I, II e II (compostos 7, 13 e 14) e (epi) galocatequina I e II (compostos 11 e 15). As (epi) catequinas hexosídeo I e III apresentaram espectro UV-visível similares aos padrões de (epi) catequina e massa exata similar ao relatado na literatura (Rada-Quifer et al., 2015). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 7 mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 451,1283 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 289,0757 [M-H-162]⁻, correspondendo à perda de um resíduo de hexose. No modo positivo, o espectro de massa mostrou a molécula protonada [M+H]⁺ a *m/z* 453,1276 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 291,0785 [M+H-162]⁺, correspondendo à perda de um resíduo de hexose. Com relação a (epi) galocatequina I, no modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 305,0690 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 261,0752 [M-H-44]⁻, correspondendo a perda de CO₂, a *m/z* 221,048 [M-H-84]⁻, perda de C₄H₄O₂ referente a clivagem do anel A de flavanol, e *m/z* 179,0406 [M-H-126]⁻, perda de C₆H₆O₃ referente a fissão de anel heterocíclico, mesma fragmentação relatada na literatura (Del Rio et al., 2004; Bravo et al., 2006; Dou et al., 2007).

O composto 10 foi identificado como ácido 3-cafeoilquínico (MM = 354,0951). Esse composto apresentou massa exata similar, espectro de MS e MS² compatíveis com o padrão de ácido 5-cafeoilquínico, sendo que a ordem de eluição foi determinada conforme dados relatados na literatura (Rada-Quifer et al., 2015).

Tabela 8. Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, de compostos fenólicos em cerveja artesanal.

(continua)

Composto	Nome	t_R (min) ^a	λ_{max} (nm) ^b	[M-H] ⁻	MS ² (-) (m/z) ^c	[M+H] ⁺	MS ² (+) (m/z) ^c	Referência ^d
1	Ácido dimetoxibenzóico I	4,2	n.d.	181,0787	163,0630/ 134,9913/ 119,0388	n.d.	n.d.	Zimmermann et al., 2011
2	Ácido 3,5-dihidroxibenzóico	11,8	n.d.	153,0219	n.d.	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009
3	Ácido gálico	11,9	270	169,0162	125,0265 (<i>fonte</i>)	n.d.	n.d.	Padrão analítico
4	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	13,5	n.d.	153,0215	n.d.	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009
5	Ácido 2,5-dihidroxibenzóico	15,5	n.d.	153,0223	n.d.	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009
6	Ácido 2,6-dihidroxibenzóico	15,8	n.d.	153,0210	n.d.	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009
7	(Epi) Catequina hexosídeo I	16,9	277	451,1283	289,0757	453,1276	291,0785/ 165,0495/ 139,0356/ 123,0368	Rada-Quifer et al., 2015
8	Ácido 2,4-dihidroxibenzóico	17,1	261	153,0219	109,0321	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009

(continuação)

9	Ácido dimetoxibenzóico II	17,3	n.d.	181,0538	163,0427/ 135,0469/ 119,0532	n.d.	n.d.	Zimmermann et al., 2011
10	Ácido 3-cafeoilquínico	17,7	n.d.	353,0906	191,0590/ 179,0321/ 135,0493 261,0752/	n.d.	n.d.	Rada-Quifer et al., 2015
11	(Epi) Galocatequina I	17,8	n.d.	305,0690	221,0481/ 179,0406/ 125,0262	n.d.	n.d.	Dou et al., 2007; Del Rio et al., 2004; Bravo et al.; 2006
12	2,3-Ácido dihidroxibenzóico	18,2	n.d.	153,0191	n.d.	n.d.	n.d.	Liu et al., 2009
13	(Epi) Catequina hexosídeo II	18,7	n.d.	451,1341	289,0795	n.d.	n.d.	Rada-Quifer et al., 2015
14	(Epi) Catequina hexosídeo III	20,0	277	451,1292	289,0757	453,1255	291,0769/ 165,0466/ 139,0349/ 123,0438	Rada-Quifer et al., 2015
15	(Epi) Galocatequina II	20,1	276	305,0701	n.d.	n.d.	n.d.	Dou et al., 2007; Del Rio et al., 2004; Bravo et al.; 2006

(continuação)

16	Ácido 3-p-cumaroilquínico	21,1	n.d.	337,0960	163,0430	n.d.	n.d.	Clifford et al., 2003
17	Ácido hidroxibenzóico I	21,2	n.d.	137,0272	n.d.	n.d.	n.d.	Rada-Quifer et al., 2015
18	Proantocianidina B dímero I	21,4	n.d.	577,1370	n.d.	n.d.	n.d.	Spínola et al., 2015
19	Taxifolin hexosídeo I	21,5	n.d.	465,1445	303,0918	n.d.	n.d.	Svensson et al., 2010.
20	Proantocianidina B dímero II	21,9	n.d.	577,1338	n.d.	n.d.	n.d.	Spínola et al., 2015.
21	Ácido 5-cafeoilquínico	22,1	n.d.	353,0901	191,0590	n.d.	n.d.	Padrão analítico
22	Ácido hidroxibenzóico II	22,5	n.d.	137,0264	n.d.	n.d.	n.d.	Padrão analítico
23	Catequina	22,7	281	289,0756	245,0863/ 203,0717/ 179,0373/ 125,0280	291,0762	165,0511/ 139,0352/ 123,0368	Padrão analítico
24	Ácido 3-feruloilquínico	22,8	281	367,1076	193,0534/ 173,0474	n.d.	n.d.	Clifford et al., 2003

(continuação)

25	Proantocianidina B dímero III	23,3	296	577,1411	451,1076/ 425,0931/ 407,0808/ 161,0225/ 125,0264	579,1359	427,0898/ 127,0332	Spínola et al., 2015
26	Taxifolin hexosídeo II	23,7	n.d.	465,1445	n.d.	n.d.	n.d.	Svensson et al., 2010
27	Quercetina hexosídeo rutinosídeo	24,2	n.d.	771,2025	n.d.	773,1894	465,0881/ 303,0424 / 129,0509	Brito et al., 2014; Roowi e Crozier, 2011
28	Proantocianidina B dímero IV	24,7	n.d.	577,1361	n.d.	n.d.	n.d.	Spínola et al., 2015
29	Epicatequina	24,7	281	289,0748	245,0862 / 205,0533/ 125,0273	291,0773	207,0562/ 165,0492/ 139,0351 / 123,0367	Padrão analítico
30	Ácido caféico	24,7	329	179,0382	135,0471	n.d.	n.d.	Padrão analítico

(continuação)

							547,1272 /	
31	Apigenina-C- glicosídeo-C- pentosídeo I	24,9	329	563,1446	n.d.	565,1381	529,1161/ 457,1009/ 445,1013 / 427,0862	Dou et al., 2007; Rada-Quifer et al., 2015
32	Proantocianidina B dímero V	25,0	n.d.	577,1405	n.d.	n.d.	n.d.	Spínola et al., 2015
33	Ácido 4-p- coumaroilquínico	25,0	n.d.	337,0919	173,0483 / 163,0419	n.d.	n.d.	Clifford et al., 2003; Fang et al., 2002
34	Apigenina-C- hexosídeo- pentosídeo II	25,2	329	563,1448	175,0439	n.d.	n.d.	Dou et al., 2007; Rada-Quifer et al., 2015
35	Quercetina di- hexosídeo	25,7	332	625,1472	593,1563/ 579,3041/ 463,0930 / 301,0301	n.d.	n.d.	Mullen et al., 2003; Bonaccorsi et al., 2008

(continuação)

							577,1388/ 475,1112/ 433,1005/ 415,0911 / 367,0695/ 313,0614	
36	Apigenina-C- hexosídeo-O- hexosídeo	25,7	332	593,1571	n.d.	595,1484		Rada-Quifer et al, 2015
37	Ácido 4- feruloilquínico	26,4	332	367,1072	193,0555/ 173,0492 / 155,0335	n.d.	n.d.	Clifford et al., 2003
38	Ácido cinâmico	27,0	289	147,0479	119,0520 / 103,0582	n.d	n.d.	Gardana et al, 2007; Gruz et al, 2008
39	Derivado de ácido cinâmico	27,1	289	353,1103	165,0622 / 147,0494	n.d.	n.d.	
40	Ácido 5- feruloilquínico	27,5	n.d.	367,1080	191,0588 / 173,0490	n.d.	n.d.	Clifford et al., 2003
41	Apigenina-6,8-C- diarabinosídeo	28,0	257 e 357	533,1923	443,1639/ 413,1492 / 353,1242/ 323,1179/ 293,1076	535,1827	463,1506/ 445,1366 / 421,1349/ 397,1357/ 367,1294	Coutinho et al, 2016

(continuação)

42	Rutina	28,1	358	609,1515	n.d.	611,1435	465,0879/ 303,0406/ 129,0500	Padrão analítico
43	Apigenina-C- hexosídeo (vitexin ou isovitexin)	28,9	n.d.	431,1019	341,0662/ 311,0595	n.d.	n.d.	Ferreres et al, 2003; Açalaret al, 2018
44	Apigenina-C- hexosídeo-O- hexosídeo II	29,5	289	593,1548	n.d.	595,1454	n.d.	Rada-Quifer et al, 2015
45	Quercetina-3-O- glicosídeo	29,9	257/ 356	463,0936	301,0387	465,0881	303,0413	Padrão analítico
46	Kaempferol-3-O- rutinosídeo	30,1	349	593,1644	285,0490	595,1467	449,0954/ 287,0473/ 129,0519	Pawlowska et al., 2009.
47	Ácido cumárico	30,4	310	163,0428	119,0519	n.d.	n.d.	Padrão analítico
48	Kaempferol-3-O- hexosídeo I	31,6	n.d.	447,0964	284,0347	449,0941	287,0468/	Dou et al., 2007; Rada-Quifer et al., 2015
49	Kaempferol-3-O- hexosídeo II	32,1	323	447,0991	285,0446	449,0941	287,0468	Dou et al., 2007; Rada-Quifer et al., 2015

(conclusão)

50	Isofraxidin hexosídeo I	34,0	n.d.	383,1366	221,0864	n.d.	n.d.	Sisó-Terraza et al., 2016
51	Isofraxidin hexosídeo II	34,8	n.d.	383,1391	221,0862	n.d.	n.d.	Sisó-Terraza et al., 2016
52	Quercetina	41,5	n.d.	301,0426	151,0079/ 179,0029/ 121,0343	303,0375	n.d.	Padrão analítico
53	Isoxanthohumol	46,8	n.d.	353,1939	233,0872/ 119,0516	n.d.	n.d.	Padrão analítico
54	8-Prenilnaringenina	47,2	n.d.	339,2051	n.d.	n.d.	n.d.	Ceslová et al., 2009
55	Isocohumulona	47,2	n.d.	347,1540	207,1060 303,1633/ 285,1527/	n.d.	n.d.	Ceslová et al., 2009
56	Xanthohumol	47,3	n.d.	353,2190	n.d.	n.d.	n.d.	Ceslová et al., 2009
57	Cohumulona	48,1	n.d.	347,1907	235,1371 291,1644/	n.d.	n.d.	Ceslová et al., 2009

Notas: ^aTempo de retenção em coluna Synergi C18 (4 µm). ^bSolvente: gradiente de 0,5% (v/v) de ácido fórmico em água e acetonitrila com 0,5% (v/v) de ácido fórmico. ^cIntensidade relativa do íons com maior abundância no MS² é mostradado em negrito. ^dReferência utilizada para tentativa identificação de cada composto. n.d. = não detectado.

Entre os derivados do ácido cumárico os compostos 16 e 33 foram tentativamente identificados como ácidos 3-*p*-cumaroilquínico (MM = 338,1002) e 4-*p*-cumaroilquínico (MM = 338,1002), respectivamente. Para a identificação tentativa desses compostos foi utilizada o ordem de eluição e as características de fragmentação das moléculas. Dou e colaboradores (2007), relataram três isômeros do ácido *p*-cumaroilquínico, ésteres formados por ácido *p*-cumárico com ácido quínico nas posições 3, 4 ou 5, sendo que a ordem de eluição em coluna C18 seria 3, 4 e 5-*p*-cumaroilquínico. No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 16 mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 337,0960 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 163,0430 [M-H-174]⁻, correspondendo à perda do resíduo de ácido quínico [ácido quínico -18], dados similares aos relatados na literatura (Dou et al., 2007; Fang et al., 2002; Clifford et al., 2003). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 33 mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 337,0959 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 173,0483 [M-H-164]⁻, correspondendo à perda de ácido cumárico, e a *m/z* 163,0438 [M-H-174]⁻, correspondendo à perda do resíduo de ácido quínico [ácido quínico -18], resultados similares aos relatados na literatura (Fang et al., 2002; Clifford et al., 2003).

O composto 17 foi identificado como ácido hidroxibenzóico I (MM =138,0317). Esse composto apresentou massa exata similar e espectro de MS² compatíveis com o padrão de ácido hidroxibenzóico (composto 22), dados similares aos relatados na literatura (Rada-Quifer et al., 2015).

Os compostos 18, 20, 25, 28 e 32 foram tentativamente identificados como dímeros de proantocianidina B (MM = 578,1424). Há dois mecanismos de fragmentação do anel heterocíclico dos flavanols: via Retro-Diels-Alder (RDA) e fissão de anel heterocíclico (FAH). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 25 mostrou a molécula desprotonada [M-H]⁻ a *m/z* 577,1411 e o espectro MS² mostrou a *m/z* 451,1076 [M-H-126]⁻, perda de C₆H₆O₃ correspondente à FAH, a *m/z* 425,0931 [M-H-152]⁻, correspondente ao rearranjo do anel heterocíclico pela via de fragmentação RDA, a *m/z* 407,0808 [M-H-152-18]⁻ e a *m/z* 289,0764 [M-H-288]⁻, correspondente à perda de uma molécula de catequina, mesma fragmentação relatada na literatura (Sun et al., 2006; Dou et al., 2007; Rockenbach et al., 2012).

Os compostos 19 e 26 foram tentativamente identificados como taxifolin hexosídeo I e II (MM = 466,1111). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 19 mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 465,1445 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 303,0918 $[M-H-162]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose. Esses dados são similares aos relatado na literatura (Svensson et al., 2010).

Os compostos 24, 37 e 40 foram tentativamente identificados com ácido 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico e 5-feruloilquínico (MM = 368,1107). As massas exatas foram similares à relatada por Rada-Quifer e colaboradores (2015) e a ordem de eluição foi determinada pela intensidade dos fragmentos gerados (Clifford et al., 2003). O espectro de massas do ácido 3-feruloilquínico, no modo de ionização negativo, mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 367,1076. O espectro MS^2 mostrou a m/z 193,0534 $[M-H-174]^-$, correspondente à perda do resíduo de ácido quínico [ácido quínico $-H_2O$], o espectro MS^2 do 4-feruloilquínico mostrou a m/z 173,0492 $[M-H-194]^-$, correspondente à perda de ácido ferúlico e o espectro MS^2 do 5-feruloilquínico mostrou a m/z 191,0593 $[M-H-176]^-$, correspondendo a perda do resíduo de ácido ferúlico [ácido ferúlico- H_2O], mesmas características de fragmentação relatadas na literatura (Clifford et al., 2003).

Os compostos 27 e 35 foram tentativamente identificados como quercetina-hexosídeo-rutinosídeo (MM = 772,2062) e quercetina di-hexosídeo (MM = 626,1483), respectivamente. O espectro de massas da quercetina-hexosídeo-rutinosídeo, no modo de ionização positivo, mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 773,1894 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 465,0881 $[M+H-308]^+$ (quercetina-3-O-glicosídeo), correspondendo a perda de rutinose e a m/z 303,0453 $[M+H-308-162]^+$ (quercetina), correspondendo à perda de rutinose e de um resíduo de hexose, fragmentação similar a relatada na literatura (Roowi e Crozier, 2011; Brito et al., 2014). O espectro de massas da quercetina di-hexosídeo, no modo de ionização negativo, mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 625,1472 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 463,0930 $[M-H-162]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose, e a m/z 301,0301 $[M-H-162-162]^-$, correspondendo à perda de dois resíduos de hexose, mesmos dados relatados na literatura (Mullen et al., 2003; Bonaccorsi et al., 2008).

Os compostos 31, 34, 36, 41, 43 e 44 foram tentativamente identificados como derivados glicosilados de apigenina. No modo de ionização positivo, o composto 31 mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 565,1381 e o espectro MS^2 mostrou a perda de 60 u, 120 u e 90 u, correspondentes à perda do C-pentosídeo e C-glicosídeo, e a perda de várias moléculas de água, dados similares aos relatados na literatura (Rada-Quifer et al., 2015). O composto 36 mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 595,1484 e o espectro MS^2 mostrou perda de 120 u e 90 u, correspondente a perda de C-glicosídeo, perda de 162 u, referente a perda de O-glicosídeo, e à perda de várias moléculas de água, dados similares aos relatados na literatura (Rada-Quifer et al., 2015).

O composto 38 foi tentativamente identificado como ácido cinâmico (MM = 148,0524), tendo apresentado espectro UV-visível e massa exata similar aos relatados na literatura (Pubchem², Gardana et al., 2007). No modo de ionização negativo, mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 147,0479 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 119,0520 $[M-H-28]^-$, correspondendo à perda de CO, e a m/z 103,0572 $[M-H-44]^-$, correspondendo à perda de CO₂, dados similares aos relatados na literatura (Gardana et al., 2007; Gruz et al., 2008).

Os compostos 46, 48 e 49 foram tentativamente identificados como kaempferol-3-O-rutinosídeo (MM = 594,1585) e kaempferol-3-O-glicosídeo I e II (MM = 448,1001), respectivamente. Esses compostos apresentaram massa exata, espectro de MS e padrões de fragmentação MS^2 similares aos relatados na literatura (Dou, et al., 2007; Rada-Quifer, et al., 2015). No modo de ionização negativo, o composto 46 mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 593,1576 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 285,0437 $[M-H-308]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de rutinose (Dou et al., 2007, Pawlowska et al., 2009).

Os compostos 50 e 51 foram tentativamente identificados como isofraxidin glicosídeo I e I (7-hidroxi-6,8-dimetoxicoumarina hexosídeo) (MM = 384,1056). No modo de ionização negativo, o espectro de massas do composto 50 mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 383,1366 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 221,0864 $[M-H-162]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose, dados similares aos relatados na literatura (Sisó-Terraza et al., 2016).

² Disponível no site <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>

O composto 53 foi identificado como isoxanthohumol (MM = 354,1467) e o composto 56 foi tentativamente identificado como xanthohumol (MM = 354,1467). O isoxanthohumol apresentou o mesmo tempo de eluição, espectro de MS e padrões de fragmentação MS² que o padrão de isoxanthohumol, mesmos dados relatados anteriormente por Ceslová e colaboradores (2009). Os compostos 54, 55 e 57 foram tentativamente identificados pela ordem de eluição e massa exata similar aos prenilflavonoides (Ceslová et al., 2009). Ainda, os compostos isocohumulona (composto 55) e humulona (composto 57) apresentaram espectro de MS e padrões de fragmentação MS² similares aos relatados na literatura (Ceslová et al., 2009; Intelmann et al., 2009).

Em geral, o perfil qualitativo dos compostos fenólicos das cervejas artesanais são similares, presente no Anexo 2, **Tabela S2**. No entanto, o ácido 3-cafeoilquínico, a proantocianidina B dímero V e a isocohumulona estão presentes em apenas uma das empresas que produzem cerveja do estilo Pilsen e ausentes em todas as amostras do estilo Weiss. Além disso, o ácido 3-*p*-cumaroilquínico, o ácido 4-*p*-cumaroilquínico, o ácido 5-cafeoilquínico e o ácido cumárico estão ausentes em todas as amostras de cervejas do estilo Weiss. Com relação ao perfil qualitativo dos compostos fenólicos da cerveja não artesanal, foi verificada a ausência de vinte compostos fenólicos, em comparação com os três estilos de cerveja artesanal. Entre os compostos ausentes pode-se citar o ácido 3-*p*-cumaroilquínico, o ácido 4-*p*-cumaroilquínico, a quercetina diglicosídeo e a isofraxidin hexosídeo, compostos que ainda não haviam sido relatados em cerveja.

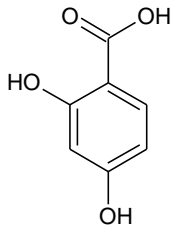
Os compostos derivados do ácido benzóico são frequentemente encontrados em cerveja (Callemien & Collin, 2010), contudo os ácidos 2,4-dihidroxibenzóico, 2,3-dihidroxibenzóico e dimetoxibenzóico (Figura 10) ainda não haviam sido relatados. Andersson e colaboradores (2008) e Kim e colaboradores (2007) relataram a presença do ácido 2,4-dihidroxibenzóico e do ácido dimetoxibenzóico, respectivamente, em cevada, assim pode-se sugerir que a origem desses compostos na cerveja seja proveniente dessa matéria-prima. Ainda, outros isômeros do ácido dihidroxibenzóico foram identificados em trigo, cevada, centeio e aveia (Khakimov et al., 2014), cereais utilizados na fabricação de cerveja. Dessa forma, o ácido 2,4-dihidroxibenzóico e o ácido 2,3-dihidroxibenzóico podem também ser provenientes de uma ou mais dessas matérias primas. Na cerveja, esses compostos

podem auxiliar na proteção contra reações oxidativas e também podem influenciar as características sensoriais de adstringência e/ou amargor (Vanderhaegen et al., 2006; Callemien & Collin, 2010). Além disso, esses compostos podem conferir benefícios à saúde, visto que apresentam atividade antioxidante e possível proteção cardiovascular (Kondo, 2004; Aron & Shellhammer, 2010; Hung, 2014; Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Valdés et al., 2015).

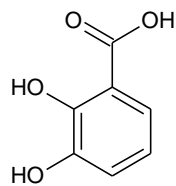
Com relação aos derivados dos ácidos fenólicos ligados ao ácido quínico, já havia sido descrita a presença de ácido feruloilquínico, contudo, sem especificação do tipo de isômero que estava presente na cerveja (Rada-Quifer et al., 2015). Em estudo realizado por Piasecka e colaboradores (2015), na qual foi realizada a extração de compostos fenólicos das folhas de cevada, verificou-se a presença do ácido 3-feruloilquínico e do ácido 4-feruloilquínico (Figura 10). Ainda, Piasecka e colaboradores (2015), observaram a presença de outro derivado dos ácidos fenólicos ligado ao ácido quínico que não havia sido descrito em cerveja: o ácido 3-*p*-cumaroilquínico (Figura 10). Desse modo, pode-se sugerir que a presença desses compostos nas cervejas avaliadas neste trabalho seja devido à existência de resquícios de folhas de cevada no malte. Adicionalmente, os ácidos 4-*p*-cumaroilquínico e 5-feruloilquínico (Figura 10) (também não descritos em cerveja) foram identificados em brácteas do lúpulo, estruturas foliáceas associadas aos cones do lúpulo (Tanaka et al., 2014). Normalmente, essas estruturas são descartadas, no entanto, não se pode ignorar a possibilidade de haver resquícios de brácteas associadas às flores do lúpulo, estando assim presentes na cerveja. Esses compostos, assim como os derivados do ácido benzoico (citados acima), podem colaborar com efeitos positivos na cerveja e desempenhar efeitos benéficos à saúde devido às suas atividades antioxidantes (Vanderhaegen et al., 2006; Okarter & Liu, 2010).

Figura 10. Compostos identificados pela primeira vez em cerveja artesanal.

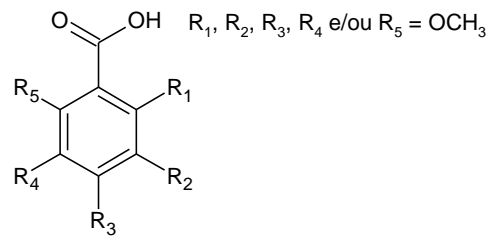
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico



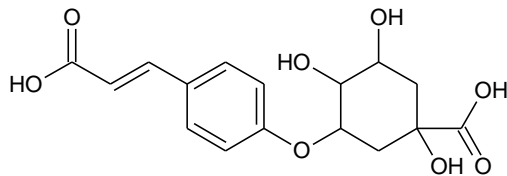
Ácido 2,3-dihidroxibenzoico



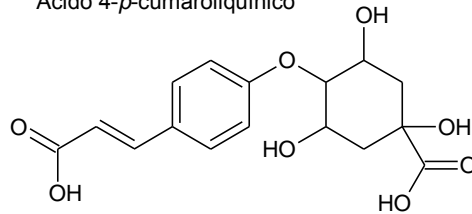
Ácido dimetoxibenzoico



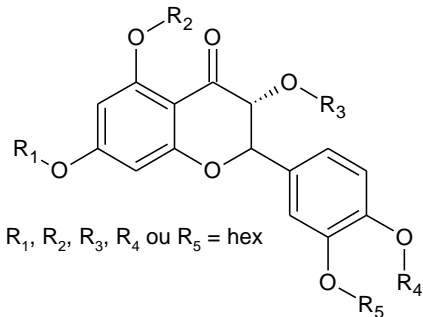
Ácido 3-*p*-cumaroilquínico



Ácido 4-*p*-cumaroilquínico

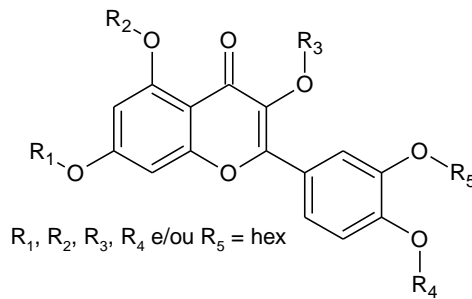


Taxifolin hexosídeo



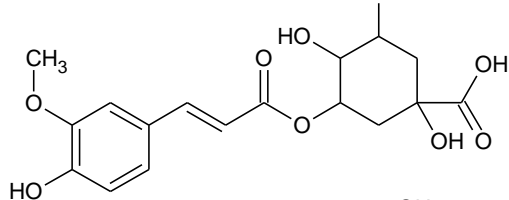
R₁, R₂, R₃, R₄ ou R₅ = hex

Quercetina di-hexosídeo

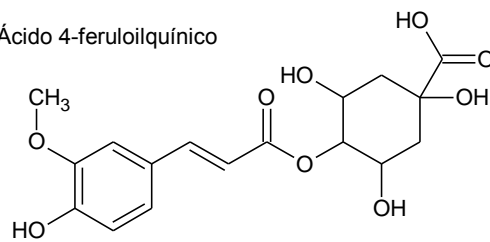


R₁, R₂, R₃, R₄ e/ou R₅ = hex

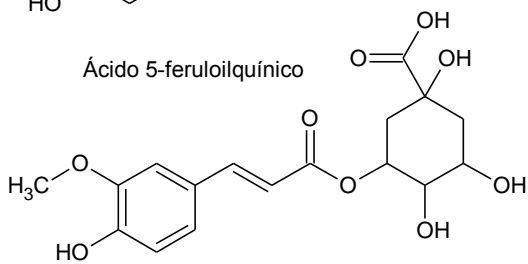
Ácido 3-feruloilquínico



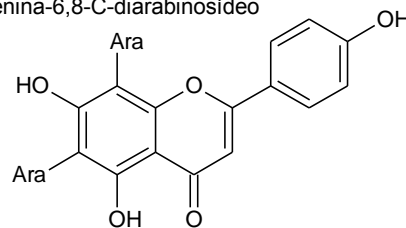
Ácido 4-feruloilquínico



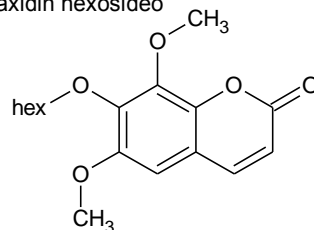
Ácido 5-feruloilquínico



Apigenina-6,8-C-diarabinosídeo



Isofraxidin hexosídeo



Fonte: própria autora.

Nota: hex=hexosídeo; Ara= arabinosídeo.

Os compostos quercetina dihexosídeo e taxifolin hexosídeo (dihidroquercetina glicosídeo) (Figura 10) ainda não haviam sido relatados em cerveja. Entretanto, derivados de quercetina glicosilados foram descritos no lúpulo (Callemien & Collin, 2010) e em cerveja (Rada-Quifer et al., 2015; Phenol-Explorer³). Ainda, Kang e colaboradores (2016) identificaram em sorgo, cereal que pode ser utilizado na fabricação de cerveja, tanto taxifolin hexosídeo quanto outros derivados glicosilados de quercetina. Possivelmente, esses compostos presentes na cerveja são originários do lúpulo e/ou do sorgo, quando este é utilizado. Na cerveja, esses flavonoides podem desempenhar papel antioxidante, contribuir com a turbidez causada pela ligação com proteínas da cevada e com as características sensoriais de amargor (Vanderhaegen, 2006; Aron & Shellhammer, 2010). Estudos demonstram que a quercetina pode atuar como antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo, além de contribuir para a atenuação da aterosclerose (Boots et al, 2008; Kleemann et al., 2011). Apesar da biodisponibilidade dos derivados glicosilados de quercetina ser diferente da quercetina livre, seus efeitos antioxidantes são mantidos (Hollman & Katan, 1999).

Anteriormente, foram descritos em cerveja derivados de apigenina (Rada-Quifer et al., 2015; Phenol-Explorer³), no entanto, ainda não havia sido descrita a presença de apigenina-6,8-C-diarabinosídeo (Figura 10). Foi descrita a presença de derivados de apigeninas em folhas de cevada (Piasecka et al., 2015), podendo estar relacionada com a presença de apigenina-6,8-C-diarabinosídeo na cerveja, visto que podem haver resquícios de folhas após a colheita da cevada. Não há relatos de como as apigeninas possam atuar na cerveja, contudo pode-se sugerir que atue como antioxidante, assim como outros flavonoides. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a apigenina apresenta atividade antioxidante, antiproliferativa, hepato-protetora e antígenotóxica (Leopoldini et al., 2004; Singh et al., 2004; Yang et al., 2013; Ali et al., 2014; Jung, 2014), assim acredita-se que esse derivado possa exibir atividades similares.

Algumas cumarinas foram relatadas em cerveja (Callemien & Collin, 2010; Phenol-Explorer²), entretanto a isofraxidin hexosídeo (Figura 10) ainda não havia sido relatada. Kumaraswamy e colaboradores (2011) relataram a presença de

³ Disponível no site < <http://phenol-explorer.eu/> >

cumarinas em cevada resistente ao fungo *Fusarium*, assim pode-se sugerir que a presença de isofraxidin hexosídeo esteja relacionada com a cevada. Há poucos relatos de cumarinas em cerveja, no entanto, pode-se sugerir que isofraxidin hexosídeo apresente atividade antioxidante na cerveja. Foi relatado que cumarinas apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, hepato-protetora e anticoagulante (Bilgin et al., 2011; Venugopala et al., 2013; Witaicenis et al., 2014), deste modo pode-se sugerir a possibilidade da isofraxidin hexosídeo apresentar atividades semelhantes.

5.3. Determinação de compostos nitrogenados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Neste trabalho foram tentativamente identificados 16 compostos nitrogenados (Tabela 9) por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Os espectros de massas desses compostos estão presentes no Apêndice B. Primeiramente a tentativa identificação dos compostos nitrogenados será discutida. Em seguida a possível origem desses compostos será abordada. Além disso, será discutida a importância desses compostos nas características sensoriais da cerveja e os possíveis benefícios à saúde associados à presença desses compostos.

O composto 2 foi tentativamente identificado como 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) (MM = 165,0426), composto da classe dos benzoxazinoides. No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 166,0808 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 120,0779 $[M+H-46]^+$, correspondendo à perda de CH_2O_2 , dados similares aos relatados na literatura (Bruijn et al., 2016).

O composto 3 foi tentativamente identificado como DIBOA-hex (MM = 343,0903). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 342,0891 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 324,0477 $[M-H-18]^-$, correspondendo à perda de H_2O , m/z 162,0233 $[M-H-162-18]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose e H_2O , m/z 134,0278 $[M-H-162-46]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose e CH_2O_2 , dados similares aos relatados na literatura (Pihlava & Kurtelius, 2016; Bruijn et al., 2016).

O composto 4 foi tentativamente identificado como cumaroil-hidroxi-agmatina (MM = 292,1535). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 293,1525 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 275,1386 $[M+H-18]^+$, correspondendo à perda de H_2O , m/z 216,0949 $[M+H-44-18-15]^+$, correspondendo à perda de CO_2 , H_2O e metila (CH_3), e m/z 147,0397 $[M+H-146]^+$, correspondendo a perda de resíduo de hidroxiagmativa ($C_5H_{14}N_4O$), dados similares aos relatados na literatura (Pihlava, 2014).

O composto 5 foi tentativamente identificado como met-cumaroilagmatina (MM = 290,1743). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 291,1364 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 273,1269 $[M+H-18]^+$, correspondendo à perda de H_2O , m/z 255,1106 $[M+H-18-18]^+$, correspondendo à perda de duas moléculas de H_2O , m/z 147,0365 $[M+H-144]^+$, correspondendo a perda de resíduo de metil agmativa ($C_6H_{16}N_4$) e m/z $[M+H-164]^+$, correspondendo a perda de resíduo de ácido cumárico ligado a uma amina primária ($C_9H_{10}NO_2$), dados similares aos relatados por Pihlava (2014).

O composto 6 foi tentativamente identificado como feruloilputrescina (MM =264,1474). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 265,1482 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 177,0493 $[M+H-88]^+$, correspondendo à perda de putrescina ($C_4H_{12}N_2$), e m/z 144,0407 $[M+H-88-15-18]^+$, correspondendo à perda de putrescina, CH_3 e H_2O , dados similares aos relatados na literatura (Pihlava, 2014).

O composto 7 foi tentativamente identificado como met-cumaroilagmatina hexosídeo (MM =452,2271). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 453,2049 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 291,1561 $[M+H-162]^+$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose, m/z 127,03516 $[M+H-162-164]^+$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose e resíduo de ácido cumárico ligado a uma amina primária ($C_9H_{10}NO_2$) e m/z 147,0365 $[M+H-144]^+$, correspondendo a perda de resíduo de metil agmativa, dados similares aos relatados na literatura (Pihlava, 2014).

Tabela 9. Características cromatográficas e espectroscópicas de compostos nitrogenados em cerveja artesanal, obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

(continua)

Composto	Nome	t _R (min) ^a	λ _{max} (nm) ^b	[M-H] ⁻	MS2 (-) (m/z) ^c	[M+H] ⁺	MS2 (+) (m/z) ^c	Referência
1	BOA	7,2	n.d.	134,0507	n.d	136,0576	119,0325	Pihlava & Kurtelius, 2016
2	MBOA	12,3	n.d.	n.d.	n.d.	166,0808	120,0779	Bruijn et al, 2016
3	DIBOA-hex	19,9	n.d.	342,0891	299,0574/ 162,0233/ 134,0278	344,2176	327,1924/ 283,1629/ 221,1331/ 177,1078/ 163,0779 / 133,0834	Pihlava & Kurtelius, 2016 Bruijn et al., 2016
4	Cumaroil-hidroxi- agmatina	19,9	n.d.	291,1502	n.d.	293,1525	275,1429/ 216,0949/ 147,0397	Pihlava, 2014

(continuação)

							273,1269/	
5	Met-cumaroilagmatina	20,5	n.d	289,1340	n.d.	291,1364	255,1162/ 147,0399/ 127,0949	Pihlava, 2014
6	Feruloilputrescina	20,8	n.d.	n.d.	n.d.	265,1482	177,0493/ 144,0435/ 122,0682	Pihlava, 2014
7	Met-cumaroilagmatina hexosídeo	21,2	n.d.	n.d.	n.d.	453,2049	372,1765/ 291,1561/ 157,1020/ 145,0429/ 127,0341/ 114,1004	Pihlava, 2014
8	Feruloil-hidroxi-agmatina	21,2	n.d.	321,1633	n.d.	323,1621	305,1529/ 177,0495	Pihlava, 2014
9	Met-feruloilagmatina	22,0	n.d.	n.d.	n.d.	321,1448	303,1351/ 285,1325/ 177,0470/ 127,0946	Pihlava, 2014

(continuação)

					233,1342/		260,1311/	
10	Cumaroilagmatina	23,2	n.d.	275,1551	258,1271/ 138,0690/ 119,0524	277,1582	218,1119/ 147,0395/ 114,0992	Pihlava, 2014
11	Feruliolagmatina	24,5	n.d.	305,1675	174,9583/ 149,0640/ 134,0383	307,1675	177,0489/ 114,0990	Pihlava, 2014
12	Sinapoilagmatina	24,8	n.d.	n.d.	n.d.	337,1772	320,1512/ 207,0581/ 131,1245/ 114,0994	Dong et al, 2015.
13	Di- cafeoilespermidina	26,9	320	468,2178	332,1611	470,2131	308,1872/ 220,0899/ 195,0764	Pihlava, 2014
14	DIMBOA-hex	28,6	n.d.	372,1607	345,0630/ 327,0518/ 231,1148/ 164,0743	374,1586	263,1295/ 209,0807/ 181,0930/ 166,0809/ 120,0775	Pihlava & Kurtelius, 2016

							(conclusão)
						481,2181/	
						322,2021/	
15	Di-feruloilespermidina	32,5	n.d.	496,2484	n.d.	498,2438	Dong et al., 2015
						234,1063/	
						177,0488/	
						133,0812	

^aTempo de retenção em coluna Synergi C18 (4 µm). ^bSolvente: gradiente de 0,5% (v/v) de ácido fórmico em água e acetonitrila com 0,5% (v/v) de ácido fórmico. ^cIntensidade relativa do íons com maior abundância no MS² é mostradado em negrito. ^dReferência utilizada para tentativa identificação de cada composto. n.d. = não detectado.

O composto 10 foi tentativamente identificado como cumaroilagmatina (MM = 276,1586). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 277,1582 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 147,0395 $[M+H-130]^+$, correspondendo à perda de resíduo de agmativa ($C_5H_{14}N_4$), resultados similares aos relatados na literatura (Pihlava, 2014).

O composto 11 foi tentativamente identificado como feruloilagmatina (MM = 306,1692). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 307,1675 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 177,0489 $[M+H-130]^+$, correspondendo à perda de resíduo de agmativa ($C_5H_{14}N_4$) e m/z 114,0962 $[M+H-193]^+$, correspondendo à perda de resíduo de ácido ferúlico ligado a uma amina primária ($C_{10}H_{11}NO_3$), resultados similares aos relatados na literatura (Pihlava, 2014).

O composto 12 foi tentativamente identificado como sinapoilagmatina (MM = 336,1798). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 337,1772 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 207,0581 $[M+H-130]^+$, correspondendo à de resíduo de agmativa ($C_5H_{14}N_4$), dados similares aos relatados por Dong e colaboradores (2015).

O composto 13 foi tentativamente identificado como di-cafeoilespermidina (MM = 469,2213). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 470,2131 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 220,0862 $[M+H-250]^+$, correspondendo à perda de resíduo de ácido caféico ligado a um resíduo de espermidina ($C_{13}H_{18}N_2O_3$), resultado similar ao relatado na literatura (Pihlava, 2014).

O composto 14 foi tentativamente identificado como DIMBOA-hex (MM = 373). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 372,1607 e o espectro MS^2 mostrou a m/z 164,0743 $[M-H-162-46]^-$, correspondendo à perda de um resíduo de hexose e CH_2O_2 , dados similares os relatados na literatura (Pihlava & Kurtelius, 2016; Bruijn et al., 2016).

O composto 15 foi tentativamente identificado como di-feruloileespermidina (MM = 497,2526). No modo de ionização positivo, o espectro de massas mostrou a molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 498,2438 e o espectro MS^2 mostrou a m/z

234,1063 [M+H-264]⁺, correspondendo à perda de resíduo de ácido ferúlico ligado a um resíduo de espermidina (C₁₄H₂₀N₂O₃), a *m/z* 177,0488 [M+H-321]⁺, correspondendo à perda de resíduo de ácido ferúlico ligado a espermidina (C₁₇H₂₇N₃O₃) e a *m/z* 133,0825 [M+H-321-44]⁺, correspondendo à perda de resíduo de ácido ferúlico ligado a espermidina e CO₂, dados similares aos relatados na literatura (Dong et al., 2015).

Em geral, as cervejas artesanais e cerveja não artesanal apresentaram perfil qualitativo de compostos nitrogenados similares (Apêndice C - Tabela S3). As únicas exceções foram os compostos BOA, MBOA e coumaroilagmatina hexosídeo que estão ausentes em todos os lotes da cerveja não artesanal.

Os benzoxazinoides já foram identificados em diversos gêneros da família *Poaceae* (Frey et al., 2009). Entre esses gêneros pode-se citar a *Hordeum* e *Triticum*, gêneros da cevada e do trigo. Desse modo, visto que diversos compostos dessa classe foram identificados em cerveja (Pihlava & Kurtelius, 2016), pode-se atribuir a origem desses compostos a essas duas matérias-primas, pois estão presentes em todos os estilos de cerveja analisadas no presente trabalho (Anexo 2 - Tabela S3). Até o momento havia sido relatada a presença desses compostos apenas em cervejas produzidas com trigo e centeio, sendo essa a primeira vez que esses compostos foram encontrados em cervejas do estilo IPA e Pilsen. Atualmente se desconhece a importância desses compostos na cerveja, sendo necessários mais estudos sobre o impacto deles sobre as características sensoriais e sobre os possíveis efeitos sobre a saúde dos consumidores. Por exemplo, alguns estudos indicam que os benzoxazinoides apresentam diversos efeitos benéficos à saúde, como estimulador do sistema nervoso central (antidepressivo e regulador do apetite), imunoregulador (anti-inflamatório e antialérgico) e antimicrobiano (Adhikari et al., 2015; Steffensen et al., 2017). Apesar disso, pesquisas precisam ser realizadas a fim de verificar se esses efeitos estão associados a esses compostos presentes na cerveja.

Anteriormente, as fenolamidas, agmatinas ligadas a ácidos hidroxicinâmicos e hidroxicinamoil putrescinas e espermidinas, já tinham sido relatadas em cerveja e em cevada (Gorzolka et al., 2014; Pihlava, 2014), desde modo acredita-se que a origem desses compostos seja a cevada. Assim como os benzoxazinoides não se

conhece os efeitos desses compostos na cerveja, sendo importante a realização de mais estudos. Esses compostos, até então haviam sido relatados apenas em cervejas do estilo *lager*, sendo essa a primeira vez que as fenolamidas são encontradas em cervejas do estilo IPA e Weiss. Com relação aos efeitos benéficos a saúde, estudos indicam que a agmatina apresenta um papel benéfico importante em doenças como diabetes mellitus, neurotrauma, distúrbios neurodegenerativos, distúrbios do humor, distúrbios cognitivos e câncer, contudo são necessários mais estudos com o propósito de verificar se esses efeitos podem ser atribuído também as agmatinas de hidroxicinâmicos presentes na cerveja (Wang et al., 2010; Piletz et al., 2013). Previamente já foi relatado que as poliaminas, espermidina e putrescina, apresentam efeitos favoráveis, como atividade antioxidante e prevenção de alergias em crianças, e prejudiciais à saúde, como aceleração do crescimento tumoral (Kalač, 2014). Entretanto, mais estudos são necessários para relacionar quais efeitos à saúde estão associados a esses compostos na cerveja.

6. CONCLUSÃO

A aplicação das técnicas SPE e HPLC-DAD-ESI-MS/MS permitiu a identificação de 57 compostos fenólicos e 15 compostos nitrogenados nas cervejas artesanais. Doze dos compostos fenólicos foram encontrados pela primeira vez em cerveja artesanal. Com relação aos compostos nitrogenados, os benzoxazinoides foram encontrados pela primeira vez em cervejas dos estilos IPA e Pilsen e as fenolamidas foram encontradas pela primeira vez em cervejas dos estilos IPA e Weiss. O perfil qualitativo dos compostos fenólicos e nitrogenados das cervejas artesanais IPA, Pilsen e Weiss é similar.

7. PERSPECTIVAS

Este estudo foi o primeiro trabalho do grupo de pesquisa sobre os compostos fenólicos e nitrogenados presentes em cervejas artesanais. Trata-se de um estudo inicial, sendo que durante o seu desenvolvimento surgiram ideias de novos trabalhos que podem ser desenvolvidos:

- a) Desenvolvimento de método por HPLC-ESI-MS para quantificar os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados em cervejas artesanais.
- b) Avaliação do impacto dos compostos fenólicos e nitrogenados sobre características sensoriais das cervejas artesanais.
- c) Avaliação da mudança do perfil dos compostos fenólicos e nitrogenados ao longo do armazenamento das cervejas artesanais do estilo IPA, Pilsen e Weiss e não artesanal do estilo American Lager.

8. REFERÊNCIAS

Adhikari, K. B.; Tanwir, F.; Gregersen, P. L.; Steffensen, S. K.; Jensen, B. M.; Poulsen, L. K.; Nielsen, C. H.; Høyer, S.; Borre, M.; Fomsgaard, I. S. Benzoxazinoids: Cereal phytochemicals with putative therapeutic and health-protecting properties. *Molecular Nutrition Food Research*, v. 59, p. 1324–1338, 2015.

Ahmad, S.; Veyrat, N.; Weeks, R.G.; Zhang, Y.; Martin, J.; Smart, L.; Glauser, G. Erb, M.; Flors, V.; Frey, M.; Ton, J. Benzoxazinoid Metabolites Regulate Innate Immunity against Aphids and Fungi in Maize. *Plant Physiology*, v.157, p.317–327, 2011.

Ali, F.; Rahul.; Naz, F.; Jyoti, S.; Siddique, Y.H. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutation Research*, v. 767, p.13-20, 2014.

Andersson, A.A.M.; Lampi, A.M; Nystrom, L.; Piironen, V.; Li, L.; Ward, J.L.; Gebruers, K.; Courtin, C.M.; Delcour, J.A.; Boros, D.; Frás, A.; Dynkowska, W.; Rakszegi, M.; Bedo, Z.; Shewry, P.R.; Aman, P. Phytochemical and Dietary Fiber Components in Barley Varieties in the Healthgrain Diversity Screen. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 56, p. 9767–9776, 2008.

Arranz, S.; Chiva-Blanch, G.; Valderas-Martínez, P.; Medina-Remón, A.; Lamuela-Raventós, R.M.; Estruch, R. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*, v. 4, p. 759-781, 2012.

Aron, P. M. & Shellhammer, T. H. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 116, n. 4, p.369–380, 2010.

Astrup, A.; Estruch, R.; Hendriks, H.; Kok, F.; Marcos, A.; Solfrizzi, V.; Zugravu, C.A. Scientific review: beer and health moderate consumption as part of a healthy lifestyle. 2016.

"Beer." *Britannica Academic, Encyclopædia Britannica*, 28 Apr. 2017. academic-eb

britannica.ez45.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/beer/106004#236418 .toc. Accessed 16 Sep. 2017.

Bamforth, C. W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. *Chemical Educator*, v.5, p.102-112, 2000.

Barth, S.J; GmbH, S.; Co, K.G. The barth report, 2017. Disponível em: <http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthberic ht20162017en.pdf>. Acesso em: 21/10/2017.

Bilgin, H.M.; Atmaca, M., Obay, B.D.; Özekinci, S.; Tasdemir, E.; Ketani, A. Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, n. 63 p. 325–330, 2011.

Bogdan P. & Kordialik-Bogacka E. Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 65, p. 1-9, 2017.

Bonaccorsi, P.; Caristi, C.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U. Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS. *Food Chemistry*, v. 107, p.1668–1673, 2008.

Boots, A. W.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, p. 325-337, 2008.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009.** Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília: 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.html>. Acesso em: 10/09/17.

Bravo, M.N.; Silva, S.; Coelho, A.V.; Boas L. V.; Bronze, M.R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, v. 563, p. 84–92, 2006.

Brien S. E.; Ronksley E. P.; Turner B.J.; Mukamal K. J.; Ghali W. A. Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart

disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ*, 342 :d636, 2011.

Briggs, E. D.; Boulton, A. C.; Brookes, P.A.; Stevens, R. *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited, England, 2004. Disponível em: <http://fars.itvhe.ac.ir/fars/Documents/99ae7cc8-c9a8-4356-8d24-f6c208322cb7.pdf>. Acesso em: 23/09/17.

Brito, A.; Ramirez, J.E.; Areche, C.; Sepúlveda, B.; Simirgiotis, M.J. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. *Molecules*, v. 19, p. 17400-17421, 2014.

Bruijn, W. J.C.; Vincken, J. P.; Duran, K.; Gruppen, H. Mass Spectrometric Characterization of Benzoxazinoid Glycosides from *Rhizopus*-Elicited Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.64, n.32, p. 6267-6276, 2016.

Caballero, I.; Blanco, C.A.; Porrás, M. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science & Technology*, v.26, p.21-30, 2012.

Callemien, D. & Collin, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolics compounds in beer – A review. *Food Reviews International*, n.26, p 1-84, 2010.

Carvalho, D.O.; Curto, A.F; Guido, L.F. Determination of Phenolic Content in Different Barley Varieties and Corresponding Malts by Liquid Chromatography-diode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Antioxidants*, v. 4, p. 563-576, 2015.

Carvalho, D.O. Beneficial effects of xanthohumol in beer: Industrial and biochemical studies. Porto, 2016, p.195. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.

Ceslová, L.; Holcapek, M.; Fidler, M.; Drstíková, J.; Lída, M. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beer and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7249-7257, 2009.

Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MS/MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 51, p. 2900-2911, 2003.

Colen, L. & Swinnen, J. F.M. Beer Drinking Nations: The Determinants of Global Beer Consumption. LICOS Centre for Institutions and Economic Performance & Department of Economics University of Leuven, Discussion Paper 270/2010.

Costanzo S.; Di Castelnuovo A.; Donati M.B.; Iacoviello L.; De Gaetano G. Alcohol consumption and mortality in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, v.55, n.13, p.1339-1347, 2010.

Cooper, R. & Nicola, G. *Natural Products Chemistry*, Chapter 6 – Phenolic Compounds, p 65–76, 2014.

Coutinho, I. D.; Baker, J. M.; Ward, J. L.; Beale, M. H.; Creste, S.; Cavalheiro, A. J. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.64, n.21, p. 4198-4206, 2016.

Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Mullen, W.; Burns, J.; Lean, M.E.J.; Brighenti, F.; Crozier, A. HPLC-MS/MS Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 52, p. 2807–2815, 2004.

Di Castelnuovo, A.; Costanzo, S.; Bagnardi, V.; Donati, M.B.; Iacoviello, L.; Gaetano, G. Alcohol dosing and total mortality in men and women. *Archives of Internal Medicine*, v.166, p. 2437-2445, 2006.

Di Castelnuovo, A.; Costanzo, S.; Di Giuseppe, R.; Gaetano, G.; Iacoviello, L. Alcohol consumption and cardiovascular risk: mechanisms of action and epidemiologic perspectives. *Future Cardiology*, v. 5, p. 467-477, 2009.

Dong X.; Gao Y.; Chen W.; Wang W.; Gong L.; Liu X.; Luo J. Spatiotemporal Distribution of Phenolamides and the Genetics of Natural Variation of Hydroxycinnamoyl Spermidine in Rice. *Molecular Plant*, v. 8, p. 111–121, 2015.

Dou, J.; Lee, V.S.Y.; Tzen, J.T.C.; Lee, M.R. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 55, p. 7462-7468, 2007.

Edreva, A. M.; Velikova, V. B.; Tsonev T. D. Phenylamides in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, v.54, n.3, p. 287–301, 2007.

Eaton, B. An Overview of Brewing. In: Priest, F.G. & Stewart, G.G. *Handbook Of Brewing*. Florida: Taylor & Francis Group, 2006. Cap.3. p. 77-89.

Eßlinger, Fermentation, Maturation and Storage. In: Eßlinger, H.M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009. Cap.8. p.207 - 224. Disponível em: https://vebriananggrya.files.wordpress.com/2013/09/handbook_of_brewing_processes_technology_markets.pdf. Acesso em: 10/09/2017.

European Brewery Convention-Analytica. Section 9, Beer, Method 9.6. Colour of Beer: Spectrophotometric Method (IM), 2000.

European Brewery Convention-Analytica. Section 9, Beer, Method 9.8. Bitterness of Beer (IM), 2004.

Facchini, P.J.; Hagel, J.; Zulak, K.G. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, v. 80, n. 6, p. 577-589, 2002.

Fang, N.; Yu, S.; Prior, R.I. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 50, p. 3579–3585, 2002.

Farag, M.A.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Wessjohann, L.A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*, v. 8, p. 492–507, 2012.

Ferreres, F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI / MS / MS : Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*) Approach to the Study of C -

Glycosyl Flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI / MS / MS : Application to Seeds of Quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, v.359, p.351-359, 2003.

French & Jupps, 2015. Figura disponível em: <http://maltspecialists.com/malt-products.html>.

Frey, M.; Schullehner, K.; Dick, R.; Fiesselmann, A.; Gierl, A. Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry*, v.70, p.1645–1651, 2009.

Gaetano, G.; Costanzo, S., Castelnuovo, A., Badimon, L.; Bejko, D.; Alkerwi, A.; Chiva-Blanch, G.; Estruch, R.; Vecchia, C.; Panico, S.; Pounis, G.; Sofig, F.; Stranges, S.; Trevisani, M.; Ursinij, F.; Cerletti, C.; Donati, M.B; Iacoviello, L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 26, n. 6, p. 443–467, 2016.

Garofalo, P. Lúpulos. In: Wolfe, Bickham, Houseman, Wotring, Sapsis, Garofalo e Hanning. *Guia para Estudos para os Exames de Cerveja do JBCP*. 2012. Cap VI. p.59-63.

Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 390–399, 2007.

Gorzolka, K.; Bednarz, H.; Niehaus, K. Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivatives of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta*, v. 239, p.1321–1335, 2014.

Gruz, J.; Novak, O.; Strnad, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 111, p. 789-794, 2008.

Hanning e Bickham. Leveduras e Fermentação. In: Wolfe, Bickham, Houseman, Wotring, Sapsis, Garofalo e Hanning. *Guia para Estudos para os Exames de Cerveja do JBCP*. 2012. Cap VI. p.54-58.

Heuberger, A.L.; Broeckling, C.D.; Sedin, D.; Holbrook, C.; Barr, L.; Kirkpatrick, K.; Prenni, J.E. Evaluation of non-volatile metabolites in beer stored at

high temperature and utility as an accelerated method to predict flavour stability. *Food Chemistry*, v. 200, p. 301–307, 2016.

Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, n. 37, p. 937-942, 1999.

Hong, J.; Smith, R.R.; Harvey, A.E.; Núñez, N.P. Alcohol consumption promotes insulin sensitivity without affecting body fat levels. *International Journal of Obesity*, v. 33, p.197–203, 2009.

Houseman & Bickham. Produção de Mosto (Mosturação). In: Wolfe, Bickham, Houseman, Wotring, Sapsis, Garofalo e Hanning. Guia para Estudos para os Exames de Cerveja do JBCP. 2012. Cap VI. p.54-58.

Hung, P.V. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, DOI: 10.1080/10408398.2012.708909.

Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.57, p.1172-1182, 2009.

Instituto da Cerveja Brasil, 2016. Cervejas artesanais no Brasil. Disponível em : <https://www.institutodacerveja.com.br/blog/n113/novidades/cervejarias-artesanais-no-brasil>. Acesso em: 13/11/2017.

Jung, W. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 33, n. 5, p. 1327-1334, 2014.

Júnior, O.C.; Junior, J.R.T.; Galinari, R.; Rawet, E.L.; Silveira, C.T.J. O setor de bebidas no Brasil. *BNDES Setorial* 40, p. 93-130, 2014. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf. Acesso em: 10/08/2017.

Kageyama, N.; Inui, T.; Fukami, H.; Komura, H. Elucidation of chemical structures of components responsible for beer aftertaste. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 69, p.255–259, 2011.

Kalac, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*, v. 161, p. 27–39, 2014.

Kang, J.; Price, W.E.; Ashton, J. ;Tapsell, L.C.; Johnson, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, n. 211, p. 215–226, 2016.

Karabín, M.; Hudcová, T.; Jelínek, L.; Dostálek, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, v.33, n.6, parte 2, p.1063-1090, 2015.

Khakimov, B.; Jespersen, B.M.; Engelsen, S.B. Comprehensive and Comparative Metabolomic Profiling of Wheat, Barley, Oat and Rye Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Advanced Chemometrics. *Foods*, n. 3, p. 569-585, 2014.

Keukeleire, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, v.23, n.1, 2000.

Kim, M.J; Hyun, J.N.; Kim, J.E.; Park, J.C.; Kim, M.I.; Kim, J.G.; Lee, S.G.; Chun, S.C.; Chung, I.M. Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 4802-4809, 2007.

Kirin Beer University Report, 2015. Disponível em: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.html. Acesso em: 03/07/17.

Kleemann, R.; Verschuren, L.; Morrison, M.; Zadelaar, S.; Erk, M.J.; Wielinga, P.Y.; Kooistra, T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis*, v. 218, p. 44– 52, 2011.

Kondo, K. Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *BioFactors*, v. 22, p. 303–310, 2004.

Kong, Y. Flavonoids. In: *Introduction to Natural Products Chemistry*. CRC Press, julho 2011, p.169 -188.

Kreisz, Malting. In: Eßlinger, H.M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009. Cap.6. p.147 - 164. Disponível em: https://vebriananggrya.files.wordpress.com/2013/09/handbook_of_brewing_processes_technology_markets.pdf. Acesso em: 10/09/2017.

Krottenthaler, Hops. In: Eßlinger, H.M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009. Cap.3. p.85 - 101. Disponível em: https://vebriananggrya.files.wordpress.com/2013/09/handbook_of_brewing_processes_technology_markets.pdf. Acesso em:10/09/2017.

Kucharska, A. & Fecka, I. Identification of iridoids in Edible Honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* sevast.) by UPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Molecules*, v. 21, n. 9, p. 1-24, 2016.

Kumaraswamy, K.G.; Kushalappa, A.C.; Choo, T.M.; Dion, Y.; Rioux, S. Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 37, p. 846–856, 2011.

Larsson, S.C.; Wallin, A.; Wolk, A. Alcohol consumption and risk of heart failure: meta-analysis of 13 prospective studies. *Clinical Nutrition* (2017), doi: 10.1016/j.clnu.2017.05.007.

Leopoldini, M.; Pitarch, I.P.; Russo, N.; Toscano, M. Structure, Conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. a first principle theoretical study. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 108, n. 1, 2004.

Lima, E.S. e Couto, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

Liu, D.; Su, Z.; Wang, C.; Gu, M. Separation of five isomers of dihydroxybenzoic acid by high-speed counter-current chromatography with dual-rotation elution method. *Journal of Chromatographic Science*, v. 57, n.5., p. 345-348, 2009.

Macready, A.L.; George, T.W.; Chong, M.F.; Alimbetov, D.S.; Jin, Y.; Vidal, A.; Spencer, J.P.E.; Kennedy, O.B.; Tuohy, K.M.; Minihane, A.M.; Gordon, M.H.; Lovegrove, J.A. Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease—FLAVURS: a randomized controlled trial¹⁻⁵. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2014, ajcn. 074237.

Maietti, A.; Brighenti, V.; Bonetti, G.; Tedeschi, P.; Prencipe, F.P.; Benvenuti, S.; Brandolini, V.; Pellati, F. Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L.(hop). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.043>, 2017.

Maltsters Association of Great Britain. Roast Malt Ring Check. 2011. Disponível em: <http://www.ukmalt.com/roast-malt-ring-check>. Acesso em: 21/10/2017.

Meussdoerffer, F. e Zarnkow, M. Starchy Raw Materials. In: Eßlinger, H.M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009. Cap.2. p.43-71. Disponível em: https://vebriananggrya.files.wordpress.com/2013/09/handbook_of_brewing_processes__technology__markets.pdf. Acesso em: 05/10/17.

Mullen, W.; Yokota, T.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry*, v. 64, p. 617-624, 2003.

Naczki, M. & Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v.1054, p. 95-111, 2004.

Nunes, N.M.; Brito, T.C.; Fonseca, N.D.; Aguiar, P.F.; Monteiro, M.; Perrone, D.; Torres, A.G. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and

styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 199, p. 105–113, 2016.

Okarter, N. & Liu, R.H. Health Benefits of Whole Grain Phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 193–208, 2010.

O'Keefe, J.H.; Bhatti, S.K.; Bajwa, A.; DiNicolantonio, J.J.; Lavie, C.J. Alcohol and Cardiovascular Health: The Dose Makes the Poison.or the Remedy. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 89, n. 3, p.382-393, 2014.

Oladokun, O.; Tarrega, A.; James, S.; Smart, K.; Hort, J.; Cook, D. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry*, v. 205, p. 212–220, 2016.

Önder, F.C.; Ay, M.;Sarker, S.D. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC–MS/MS and GC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 10498–10506, 2013.

Pawlowska, A. M.; Camangi, F.; Bader, A.; Braca, A. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chemistry*, v. 112, n.4, p. 858-862, 2009.

Piasecka, A.; Sawikowska, A.; Krajewski, P.; Kachlicki, P. Combined mass spectrometric and chromatographic methods for in-depth analysis of phenolic secondary metabolites in barley leaves. *Journal Mass Spectrometry*, v. 50, p. 513-532, 2015.

Piazzon, A.; Forte, M.; Nardini, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 10677–10683, 2010.

Pihlava, J. M. Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOFMS. *Journal of Cereal Science*, v.60, p.645–652, 2014.

Pihlava, J. M. & Kurtelius, T. Determination of benzoxazinoids in wheat and rye beers by HPLC-DAD and UPLC-QTOF MS. *Food Chemistry*, v.204, p.400-408, 2016.

Piletz, J.E.; Aricioglu, F.; Cheng, J.T.; Fairbanks, C.A.; Gilad, V.H.; Haenisch, B.; Halaris, A.; Hong, S.; Lee, J.E.; Li, J.; Liu, J.; Molderings, G.J.; Rodrigues, A.L.S.; Satriano, J.; Seong, G.J.; Wilcox, G.; Wu, N.; Gilad, G.M. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 17/18, p. 880-893, 2013.

Possemiers, S.; Rabot, S.; Espin, J.C.; Bruneau, A.; Philippe, C.; Gonzalez-Sarrias, A.; Heyerick, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Keukeleire, D.; Verstraete, W. Eubacterium limosum activates isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. *The Journal of Nutrition*, v. 138, n. 7, p.1310-1316, 2008.

Rada-Quifer, P.; Queralt, A.V.; Huélamo, M.M.; Blanch, G.C.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Raventós, R.L. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, v. 169, p. 336-343, 2015.

Rehm, J. & Roerecke, M. Cardiovascular effects of alcohol consumption. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v.27, n.8, p.534-538, 2017.

Rimbau, A.T.; Rimm, E.B.; Remón, A.M.; González, M.A.M.; Sabater, C.L.; Covas, M.; Corella, D.; Salvadó, J.S.; Gracia, E.G.; Lapetra, J.; Arós, F.; Fiol, M.; Ros, E.; Majem, S.L.; Pintó, X.; Muñoz, M.A.; Gea, A.; Gutiérrez, V.R.; Estruch, R.; Raventós, R.M.L. Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Med*, 12:77, 2014.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic. *Acids Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

Roberts, T.R. & Wilson, R.J.H. Hops. In: Stewart, G.G.; Priest, F.G. *Handbook Of Brewing*. Florida: Taylor & Francis Group, 2006, Cap. 7, P. 177-279.

Rockenbach, I.I.; Jungfer, E.; Ritter, C.; Santiago-Schübel, B.; Thiele, B.; Fett, R.; Galensa, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Research International*, v. 48, p. 848–855, 2012.

Rodrigues, E.; Mariutti, L.R.B.; Mercadante, A.Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 3022–3029, 2013.

Roowi, S. & Crozier, A. Flavonoids in Tropical Citrus Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 12217–12225, 2011.

Ross, J.A.; Kasum, C.M.; Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p. 19–34, 2002.

Russell, I. Yeast. An Overview of Brewing. In: Priest, F.G. & Stewart, G.G. *Handbook Of Brewing*. Florida: Taylor & Francis Group, 2006. Cap.8. p. 281- 332.

Sapis, D. Maltes e adjuntos. In: Wolfe, Bickham, Houseman, Wotring, Sapsis, Garofalo e Hanning. *Guia para Estudos para os Exames de Cerveja do JBCP*. 2012. Cap VI. p.50-53.

Spearot, J.W. Influence of Beer Color on Perception of Bitterness. 2016. 104 f. *Dissertação (Mestrado em Food Science) - Drexel University, Pensilvânia*. 2016.

Stevens, J. F. & Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry*, v.64, n.10, p. 1317-1330, 2004.

Sebrae Nacional, 2017. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf). Acesso: 10/08/2017.

Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, v.18, p.820–897, 2015.

Sicker, D.; Frey, M.; Schulz, M.; Gierl, A. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *International Review of Cytology*, v. 198, p.319–346, 2000.

Singh, J.P.V.; Selvendiran, K.; Banu, S.M.; Padmavathi, R.; Sakthisekaran, D. Protective role of apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, v. 11, p. 309–314, 2004.

Spínola, V.; Pinto, J.; Castilho, Paula C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, v.173, p. 14-30, 2015.

Sisó-Terraza, P.; Luis-Villarroya, A.; Fourcroy, P.; Briat, J.F.; Abadía, A.; Gaymard, F.; Abadía, J.; Álvarez-Fernández, A. Accumulation and secretion of coumarinolignans and other coumarins in *Arabidopsis thaliana* roots in response to iron deficiency at high pH. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. 1711, 2016.

Steffensen, S.K.; Adhikari, K.B.; Laursen, B.B.; Jensen, C.; Gregersen, P.L.; Bhattarai, B.; Maraís, L.M.; Schnorr, H.; Jensen, B.M.; Poulsen, L.K.; Nielsen, C.H.; Borre, M.; Borreg, M.; Høyer, S.; Fomsgaard, I.S. Bioactive small molecules in commercially available cereal food: Benzoxazinoids. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 64, p. 213–222, 2017.

Sun, J.; Liang, F.; Bin, Y.; Li, P.; Duan, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, v. 12, p 679-693, 2007.

Tanaka, Y.; Yanagida, A.; Komeya, S.; Kawana, M.; Honma, D.; Tagashira, M.; Kanda, T.; Shibusawa, Y. comprehensive separation and structural analyses of polyphenols and related compounds from bracts of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, n. 62, p. 2198–2206, 2014.

Tenge, C. Yeast. In: Eßlinger, H.M. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009. Cap.5. p.119-142. Disponível em:

https://vebriananggrya.files.wordpress.com/2013/09/handbook_of_brewing_processes__technology__markets.pdf. Acesso em: 23/09/17.

Thompson, P.L. J-curve revisited: cardiovascular benefits of moderate alcohol use cannot be dismissed. *Medical Journal of Australia*, v. 198, n. 8, p.419-422, 2013.

Tribaldo, E.B. Phenolic Compounds. In: *Handbook of Food Analysis*. Third Edition - Two Volume. Florida: Taylor & Francis Group. 2015, p.695 -715.

Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food and Function*, v.6, p.2424-2439, 2015.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p 44–84, 2007.

Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*, v. 95, p. 357–381, 2006.

Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-14, 2013.

Verzele, M. J. Centenary review - 100 years of hop chemistry and its relevance to brewin. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 92, p. 32-48, 1986.

Vinson, J.A.; Mandarano, M.; Hirst, M.; Trevithick, J.R.; Bose, P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Beers and the Effect of Two Types of Beer on an Animal Model of Atherosclerosis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.51, p. 5528-5533, 2003.

Wang, X.; Yang, L.; Yang, X.; Tian, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.94, n.8, p.1693–1700, 2014.

Wang, C.C.; Chio, C.C.; Chang, C.H.; Kuo, J.R.; Chang, C.P. Beneficial effect of agmatine on brain apoptosis, astrogliosis, and edema after rat transient cerebral ischemia. *BMC Pharmacology*, v. 11. p.1-10, 2010.

Witaicenis, A.; Seito, L.N.; Chagas, A. S.; Junior, L.D.A.; Luchini, A.C.; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Di Stasi, L.C. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*, v. 21, p. 240–246, 2014.

Wotring, G. Água. In: Wolfe, Bickham, Houseman, Wotring, Sapsis, Garofalo e Hanning. *Guia para Estudos para os Exames de Cerveja do JBCP*. 2012. Cap VI. p.54-58.

Yamaji, N.; Yokoo, Y.; Iwashita, T.; Nemoto, A.; Koike, M.; Suwa, Y.; Wakimoto, T.; Tsuji, K.; Nukaya, H. Structural Determination of Two Active Compounds That Bind to the Muscarinic M3 Receptor in Beer. *Alcoholism: clinical and experimental research*, v.31, n.S1, p. 9S–14S, 2007.

Yang, J.; Wang, X.Y.; Xue, J.; Gub, Z.L.; Xie, M.L. Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. *Food Function*, n. 4, 939–943, 2013.

Yao, J.; Zhang, B.; Ge, C.; Peng, S.; Fang, J. Xanthohumol, a Polyphenol Chalcone Present in Hops, Activating Nrf2 Enzymes To Confer Protection against Oxidative Damage in PC12 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.63, p.1521–1531, 2015.

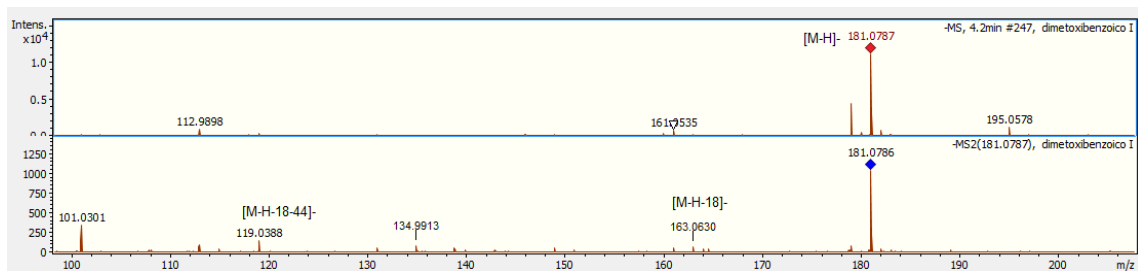
Zimmermann, B.F.; Walch, S.G.; Tinzoh, L.N.; Stühlinger, W.; Lachenmeier, D.W. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 2459–2464, 2011.

Żołnierczyk, A.K.; Mączka, W. K.; Grabarczyk, M.; Wińska, K.; Woźniak, E.; Anioł, M. Isoxanthohumol — Biologically active hop flavonoid. *Fitoterapia*, v.103, p.71–82, 2015.

Zhu, F.; Chen, J.; Wang, J.; Yin, R.; Li, X.; Jia, X. Qualitative and quantitative analysis of the constituents in Danmu preparations by UPLC–PDA–TOF–MS. *Journal of Chromatographic Science*, v. 52, p. 862–871, 2014.

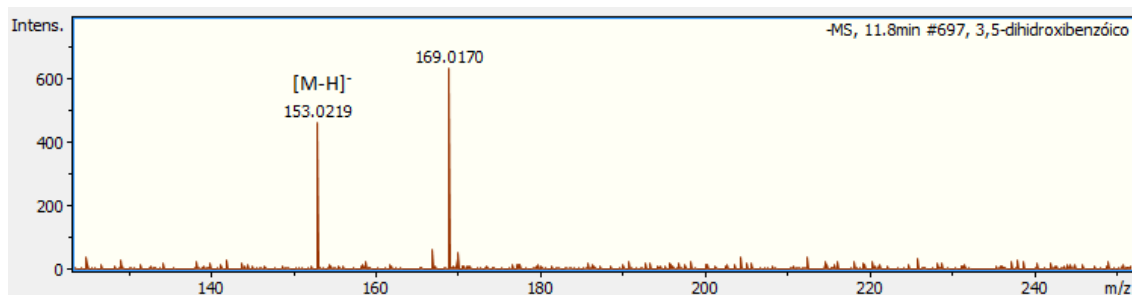
APÊNDICE A – Espectro de massas dos compostos fenólico

Figura S1. Espectro de massas do ácido dimetoxibenzoico I no modo negativo.



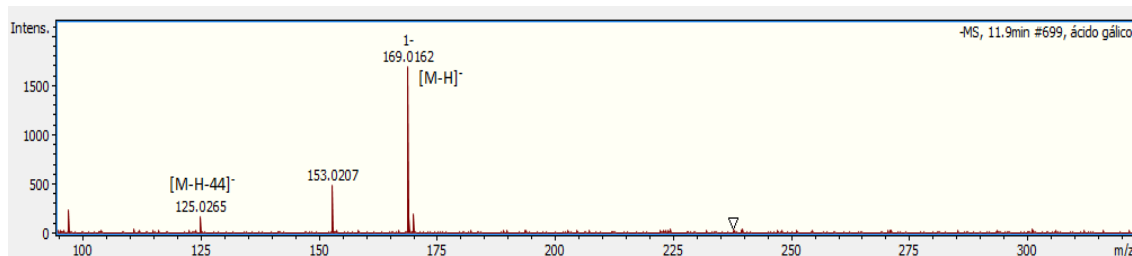
Fonte: própria autora.

Figura S2. Espectro de massas do 3,5-dihidroxibenzoico no modo negativo.



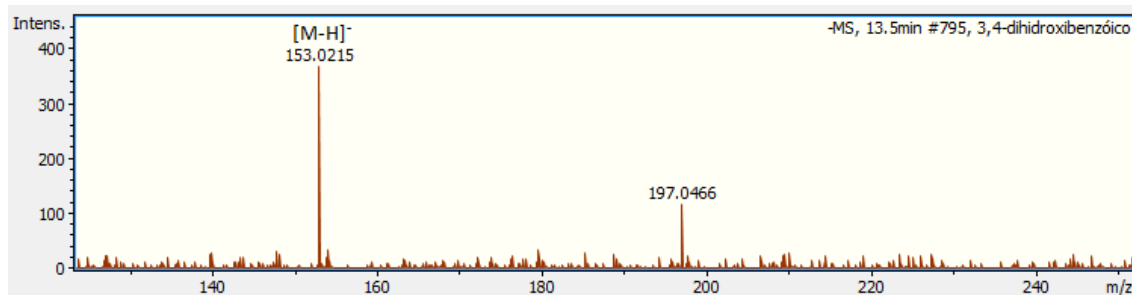
Fonte: própria autora.

Figura S3. Espectro de massas do ácido gálico no modo negativo.



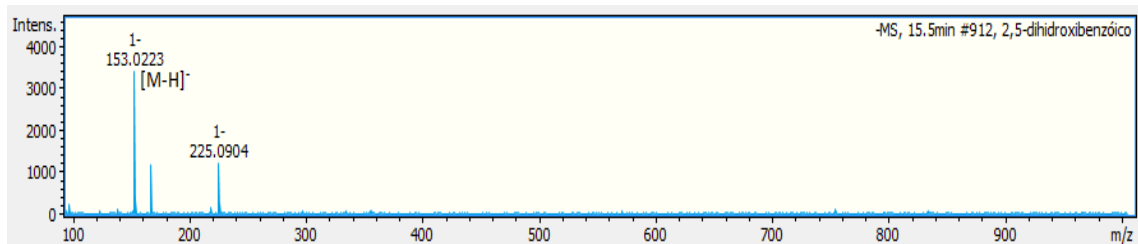
Fonte: própria autora.

Figura S4. Espectro de massas do 3,4-dihidroxibenzoico no modo negativo.



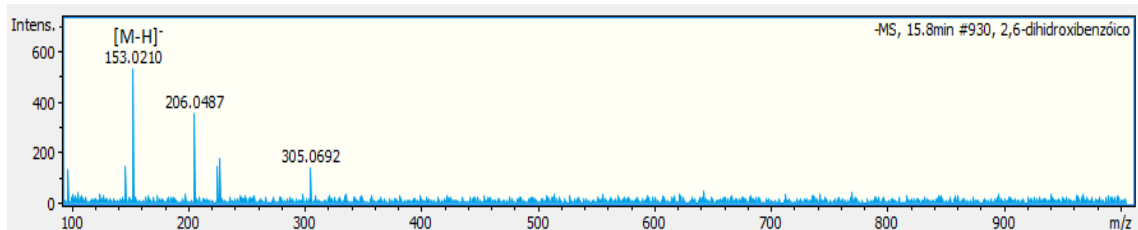
Fonte: própria autora.

Figura S5. Espectro de massas do 2,5-ácido dihidrobenzóico no modo negativo.



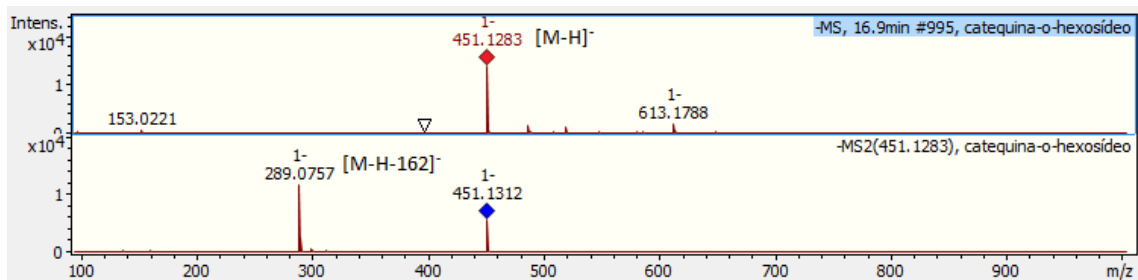
Fonte: própria autora.

Figura S6. Espectro de massas do 2,6-ácido dihidrobenzóico no modo negativo.



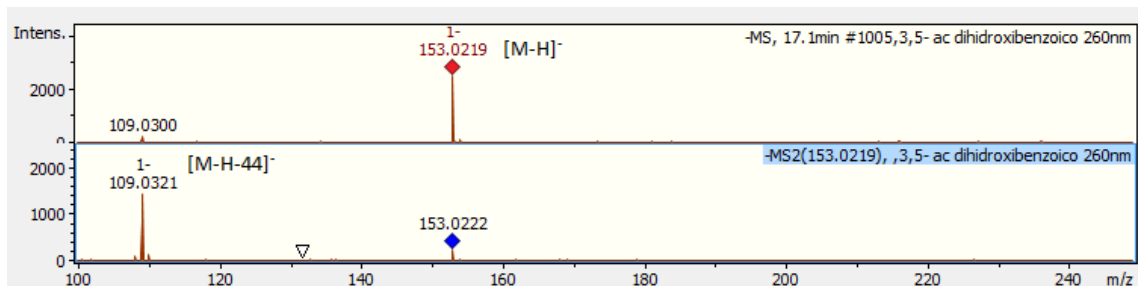
Fonte: própria autora.

Figura S7. Espectro de massas da (epi)catequina hexosídeo I no modo negativo.



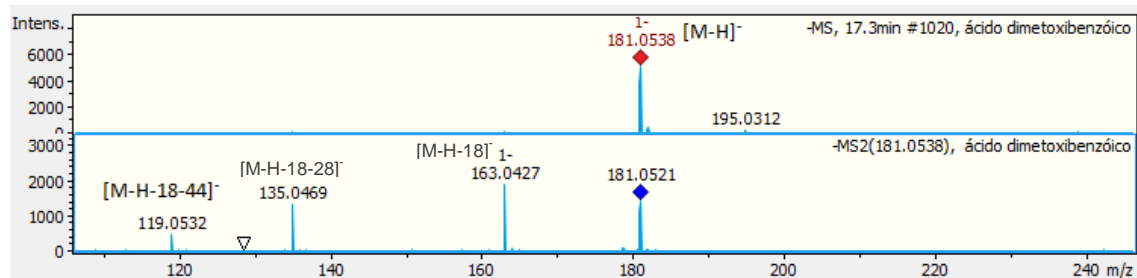
Fonte: própria autora.

Figura S8. Espectro de massas do 2,4-ácido dihidrobenzóico no modo negativo.



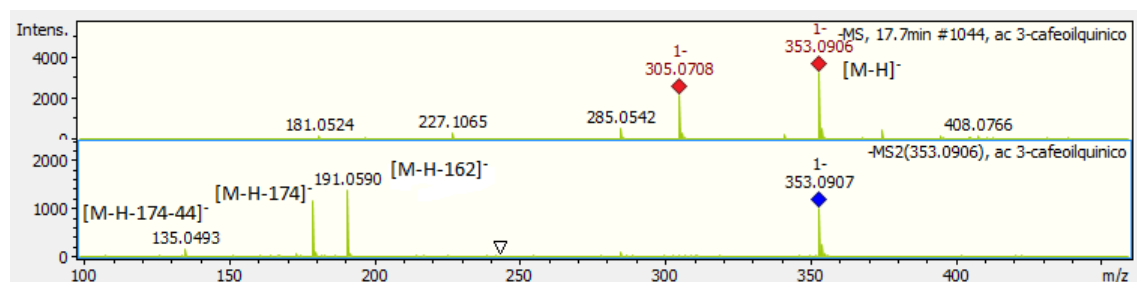
Fonte: própria autora.

Figura S9. Espectro de massas do ácido dimetoxibenzóico II no modo negativo.



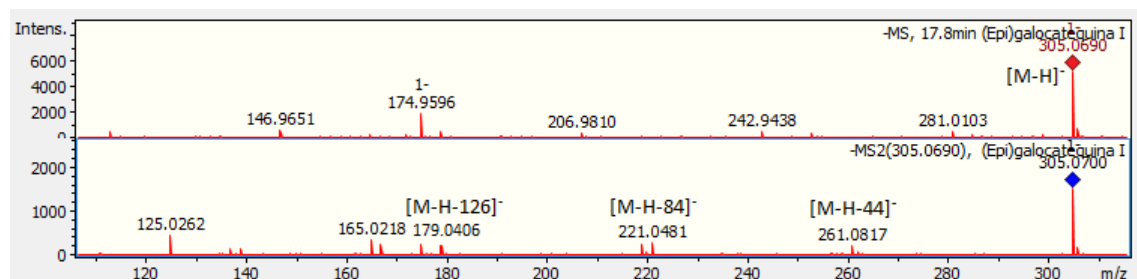
Fonte: própria autora.

Figura S10. Espectro de massas do ácido 3-cafeoilquínico no modo negativo.



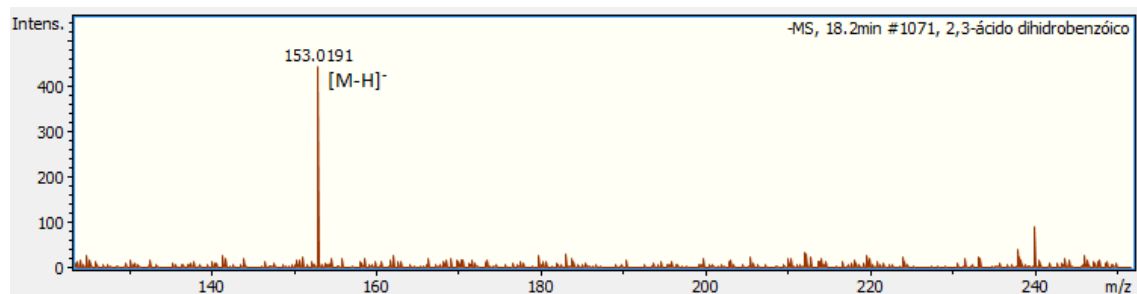
Fonte: própria autora.

Figura S11. Espectro de massas da (epi)galocatequina no modo negativo.



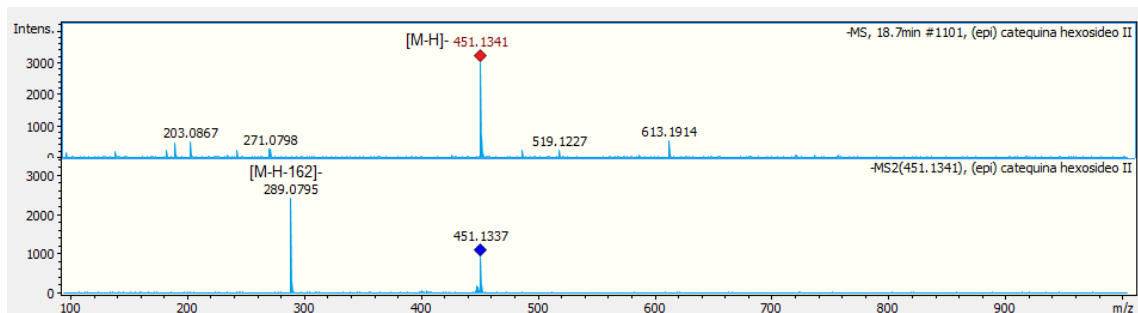
Fonte: própria autora.

Figura S12. Espectro de massas do 2,3-ácido dihidrobenzóico no modo negativo.



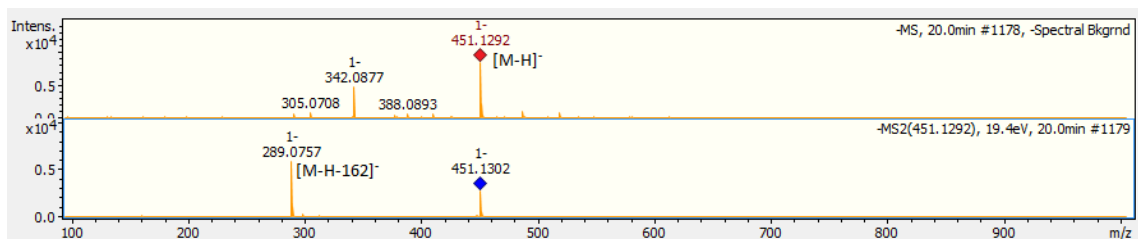
Fonte: própria autora.

Figura S13. Espectro de massas da (epi)catequina hexosídeo II no modo negativo.



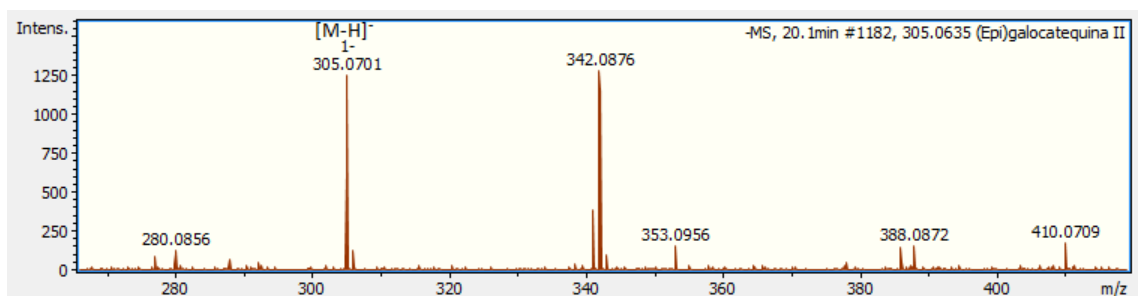
Fonte: própria autora.

Figura S14. Espectro de massas da (epi)catequina hexosídeo III no modo negativo.



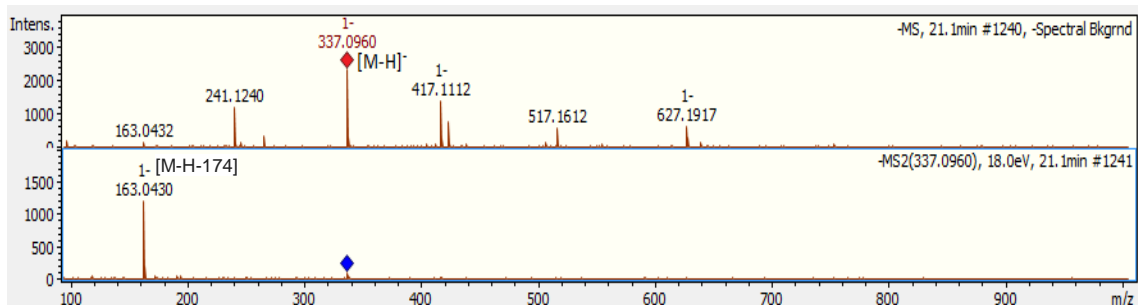
Fonte: própria autora.

Figura S15. Espectro de massas da (epi)galocatequina II no modo negativo.



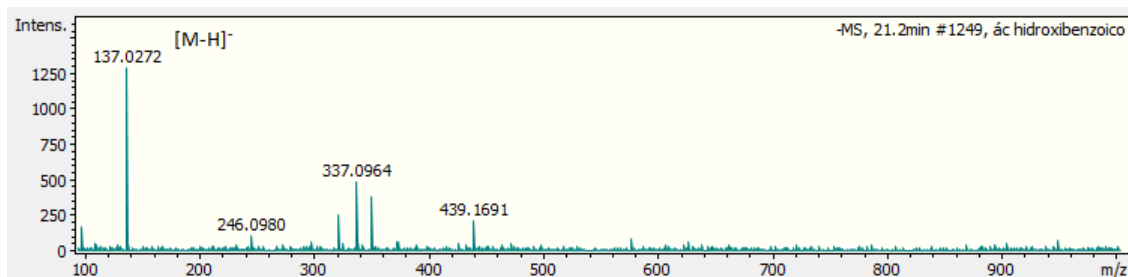
Fonte: própria autora.

Figura S16. Espectro de massas do ácido 3-p-cumaroilquínico no modo negativo.



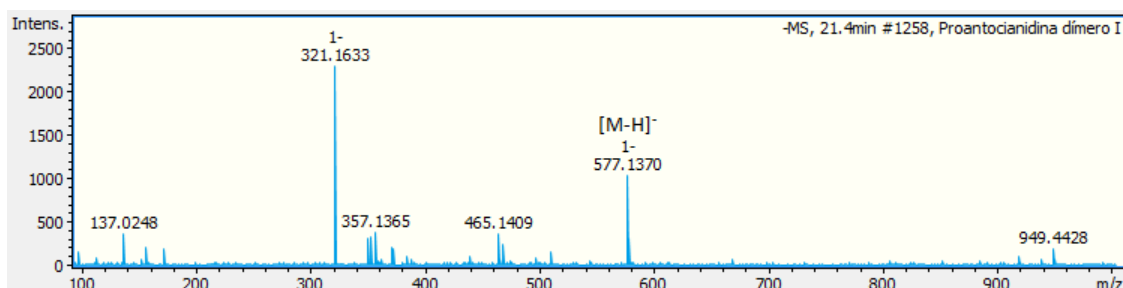
Fonte: própria autora.

Figura S17. Espectro de massas do ácido hidroxibenzoico I no modo negativo.



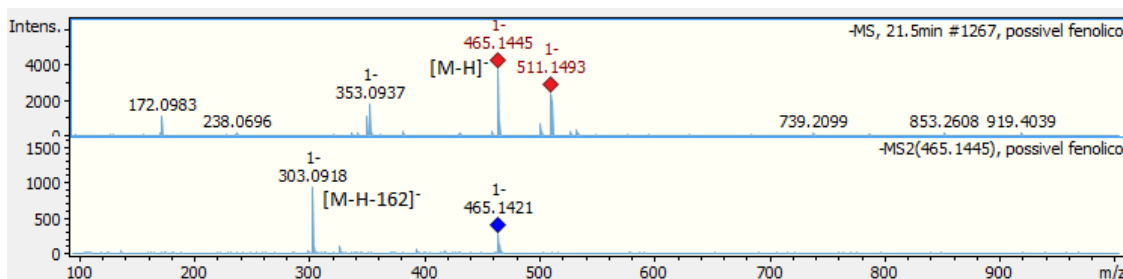
Fonte: própria autora.

Figura S18. Espectro de massas da proantocianidina B dímero I no modo negativo.



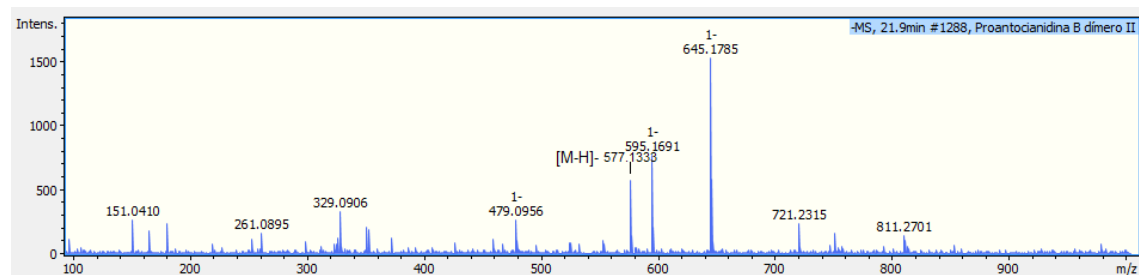
Fonte: própria autora.

Figura S19. Espectro de massas do taxifolin hexosídeo no modo negativo.



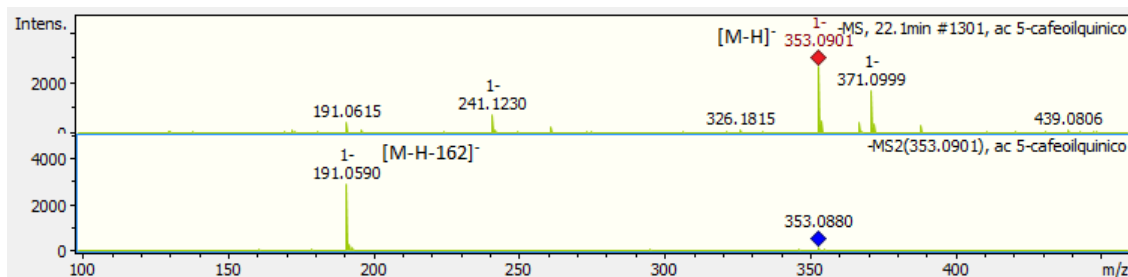
Fonte: própria autora.

Figura S20. Espectro de massas da proantocianidina B dímero II no modo negativo.



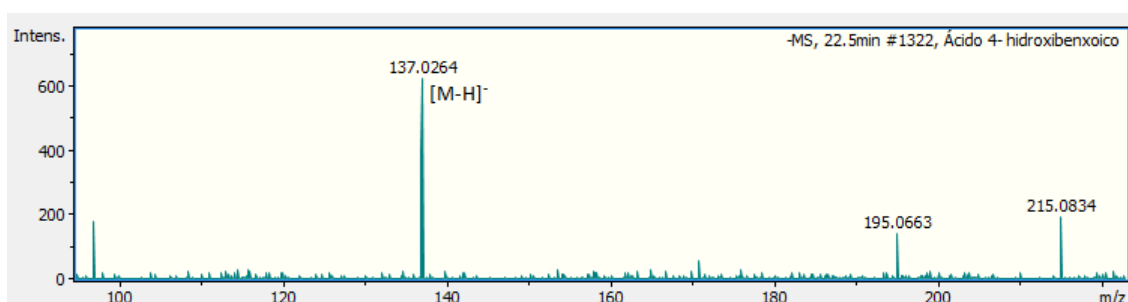
Fonte: própria autora.

Figura S21. Espectro de massas do ácido 5-cafeoilquínico no modo negativo.



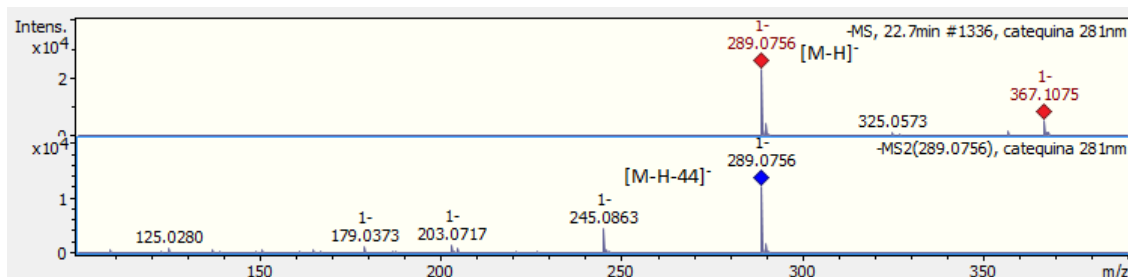
Fonte: própria autora.

Figura S22. Espectro de massas do ácido hidroxibenzoico II no modo negativo



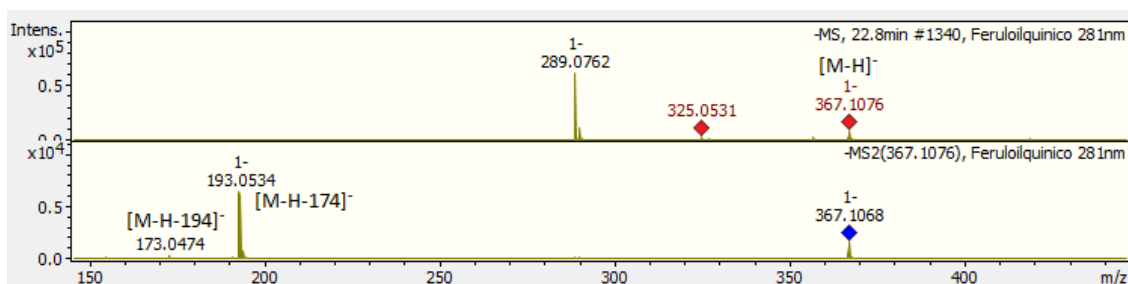
Fonte: própria autora.

Figura S23. Espectro de massas da catequina no modo negativo.



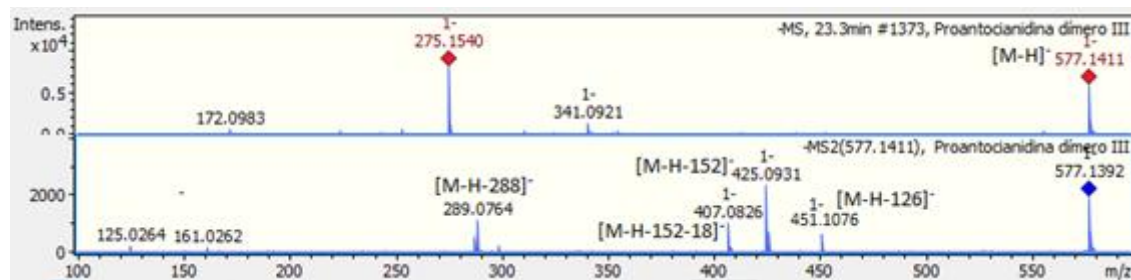
Fonte: própria autora.

Figura S24. Espectro de massas do ácido 3-feruloilquínico no modo negativo.



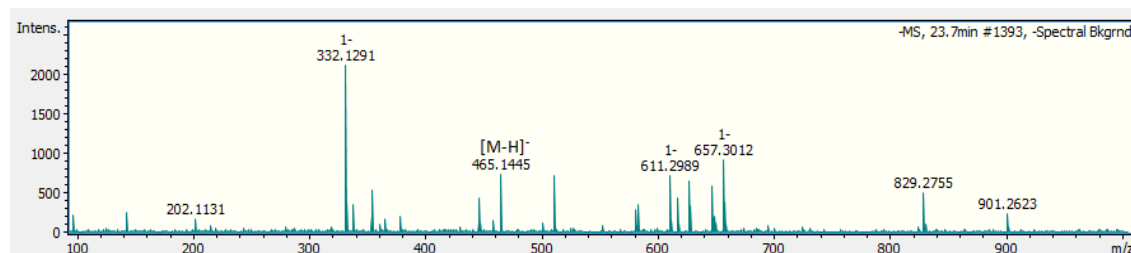
Fonte: própria autora.

Figura S25. Espectro de massas do proantocianidina dímero B III no modo negativo.



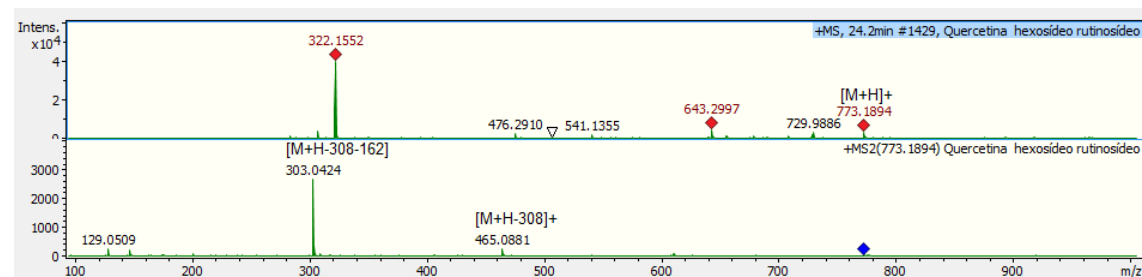
Fonte: própria autora.

Figura S26. Espectro de massas do taxifolin hexosídeo II no modo negativo.



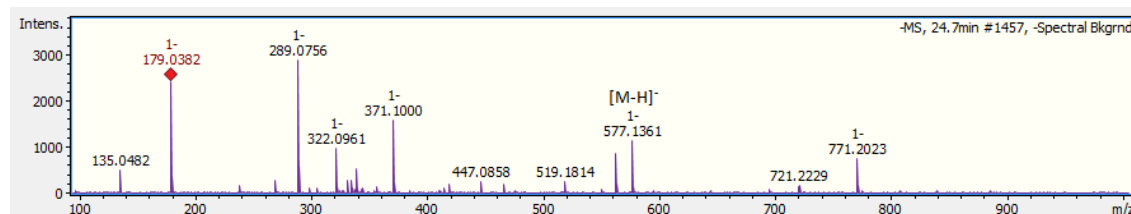
Fonte: própria autora.

Figura S27. Espectro de massas da quercetina hexosídeo rutinosídeo no modo positivo.



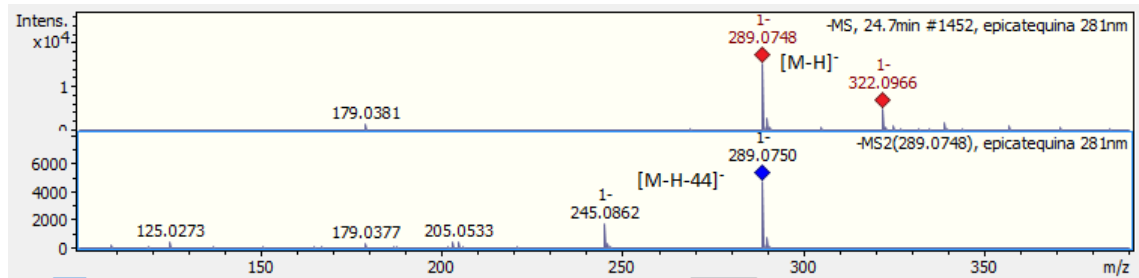
Fonte: própria autora.

Figura S28. Espectro de massas da proantocianidina dímero B IV no modo negativo.



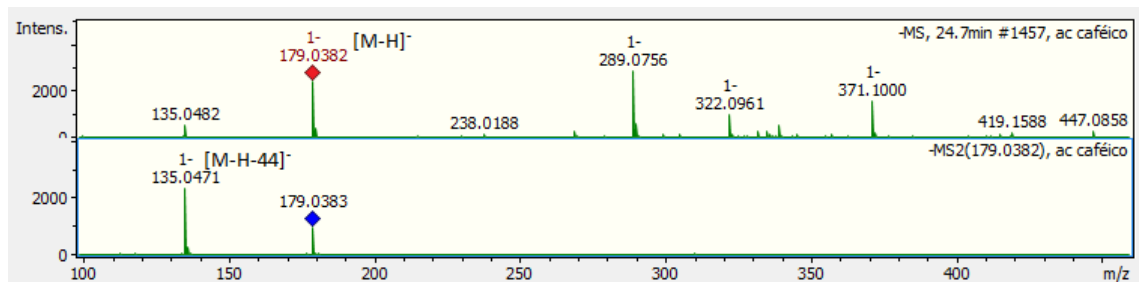
Fonte: própria autora.

Figura S29. Espectro de massas da epicatequina no modo negativo.



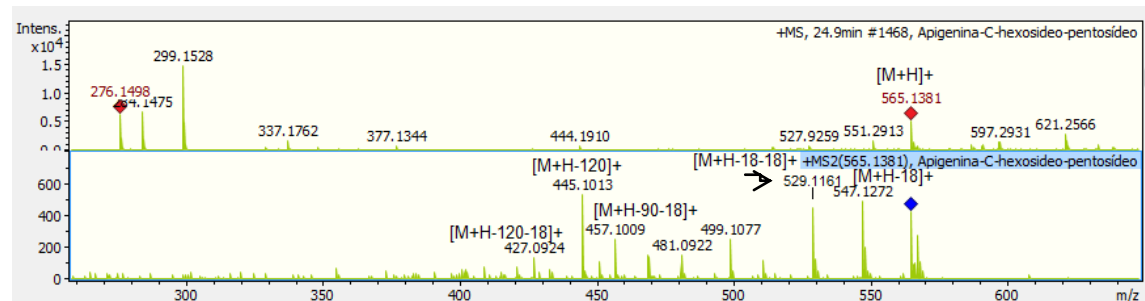
Fonte: própria autora.

Figura S30. Espectro de massas do ácido caféico no modo negativo.



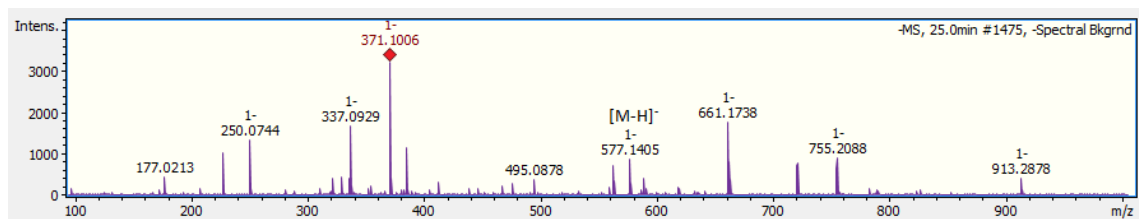
Fonte: própria autora.

Figura S31. Espectro de massas da apigenina-C-hexosídeo-pentosídeo no modo positivo.



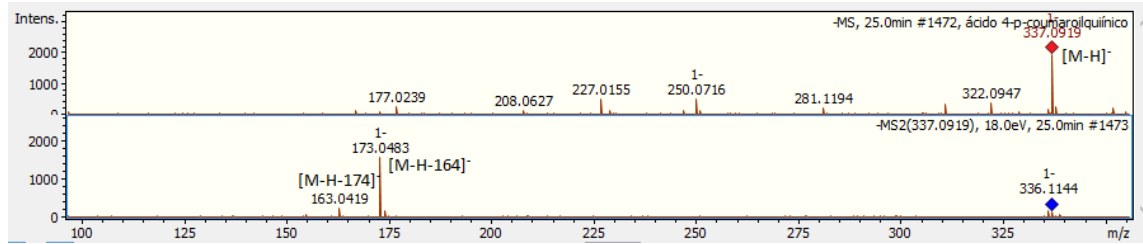
Fonte: própria autora.

Figura S32. Espectro de massas da proantocianidina B dímero V no modo negativo.



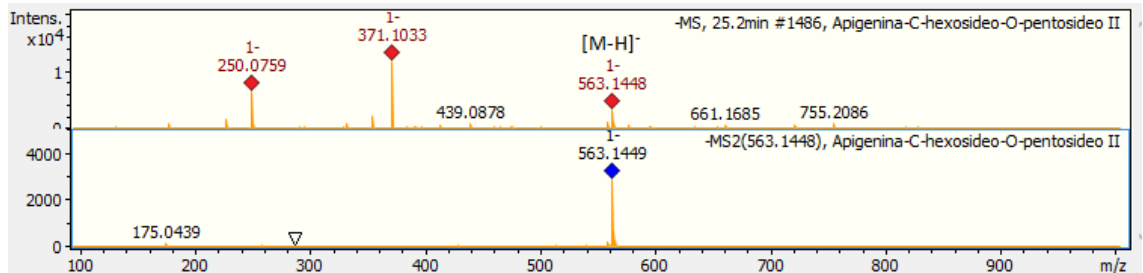
Fonte: própria autora.

Figura S33. Espectro de massas do ácido 4-coumaroilquínico no modo negativo.



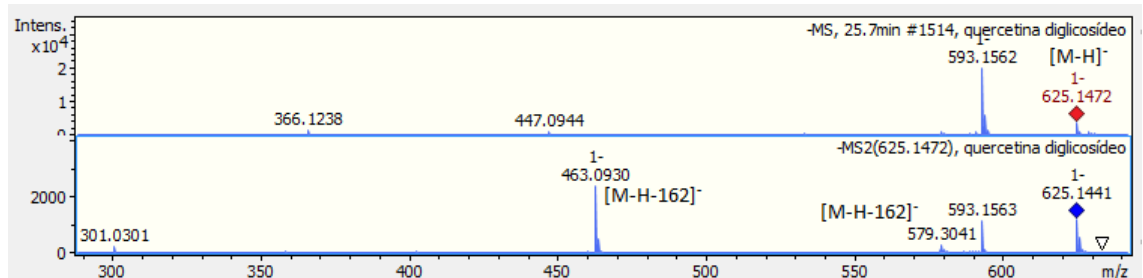
Fonte: própria autora.

Figura S34. Espectro de massas da apigenina-C-hexosídeo-pentosídeo II no modo negativo.



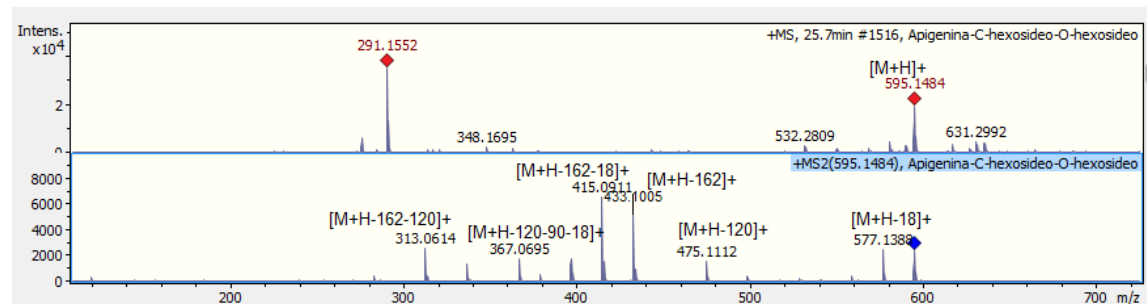
Fonte: própria autora.

Figura S35. Espectro de massas da quercetina di-hexosídeo no modo negativo.



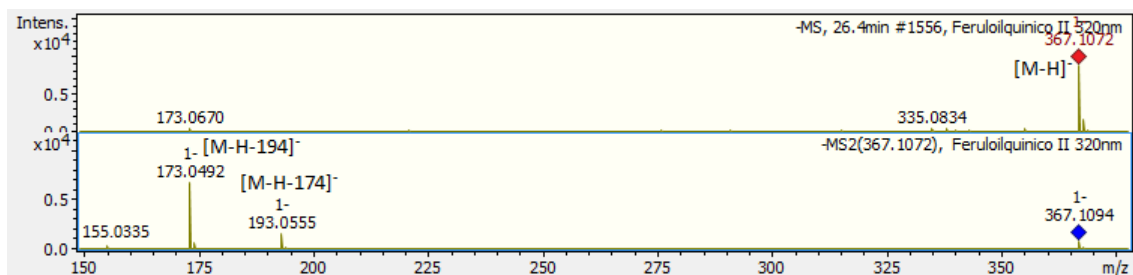
Fonte: própria autora.

Figura S36. Espectro de massas da apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo no modo positivo.



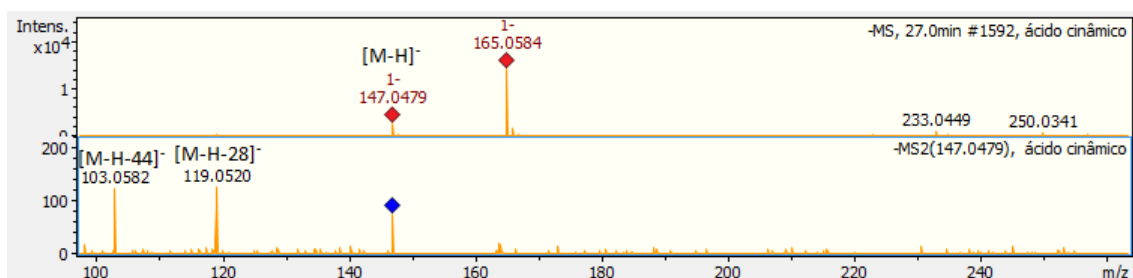
Fonte: própria autora.

Figura S37. Espectro de massas do ácido 4-feruloilquínico no modo negativo.



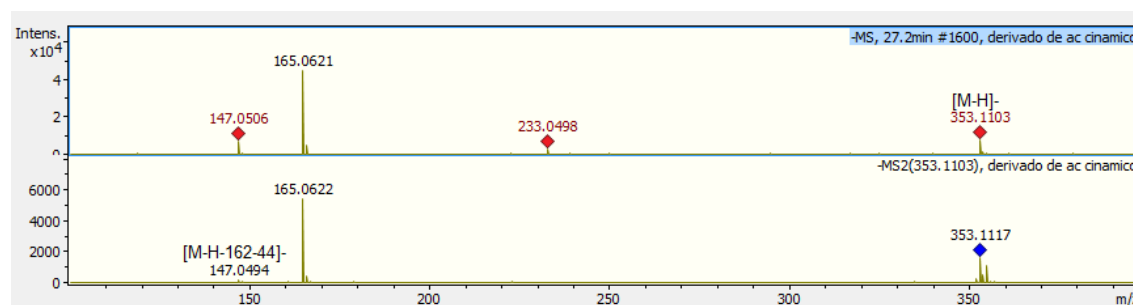
Fonte: própria autora.

Figura S38. Espectro de massas do ácido cinâmico no modo negativo.



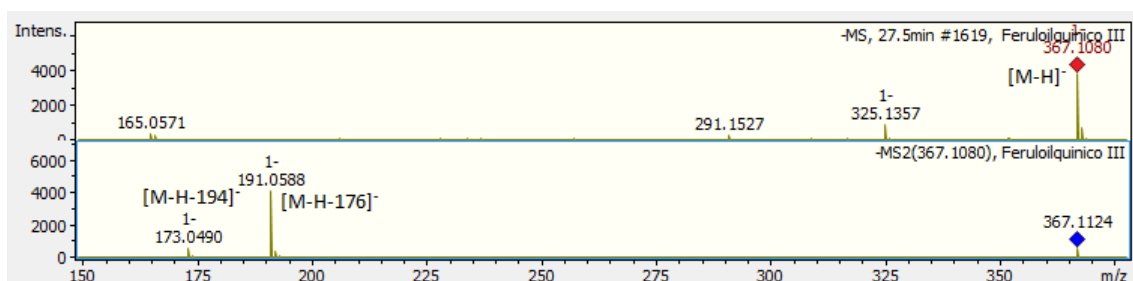
Fonte: própria autora.

Figura S39. Espectro de massas do derivado do ácido cinâmico no modo negativo.



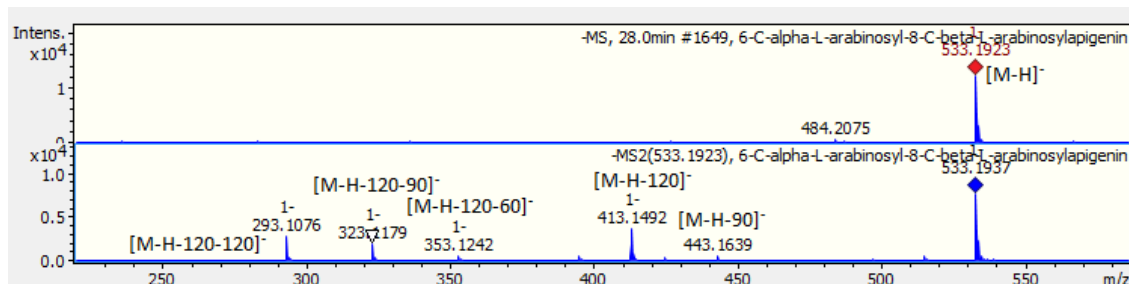
Fonte: própria autora.

Figura S40. Espectro de massas do ácido 5-feruloilquínico no modo negativo.



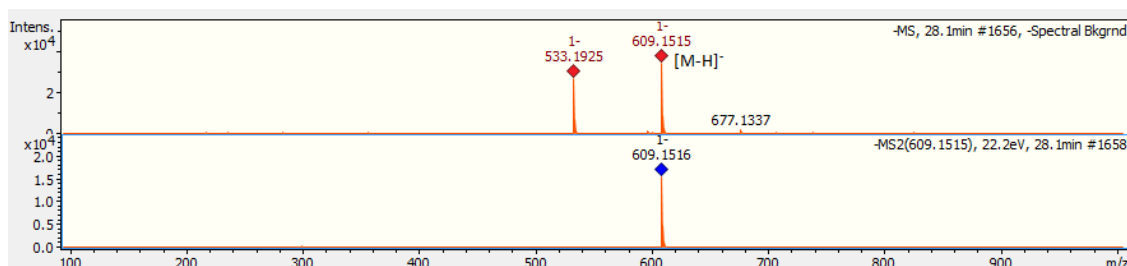
Fonte: própria autora.

Figura S41. Espectro de massas do apigenina-6,8-C-diarabinosídeo no modo negativo.



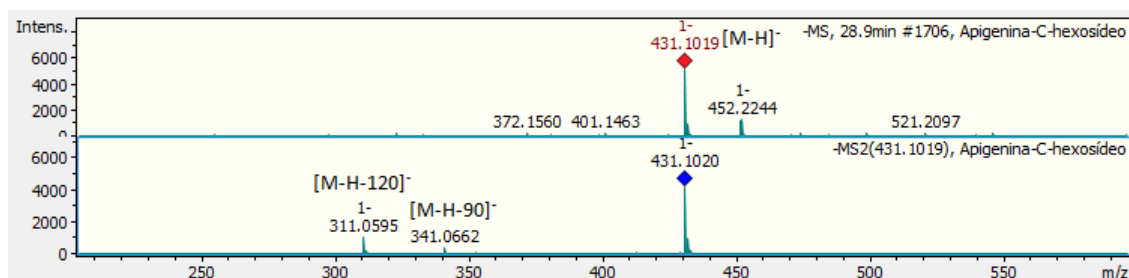
Fonte: própria autora.

Figura S42. Espectro de massas da rutina no modo negativo.



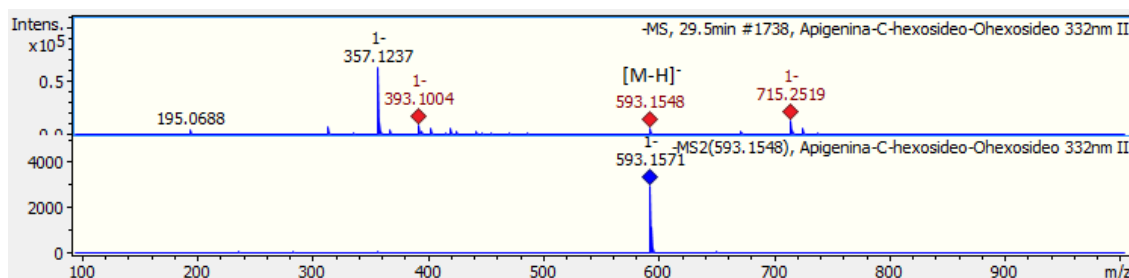
Fonte: própria autora.

Figura S43. Espectro de massas da apigenina-C-hexosídeo no modo negativo.



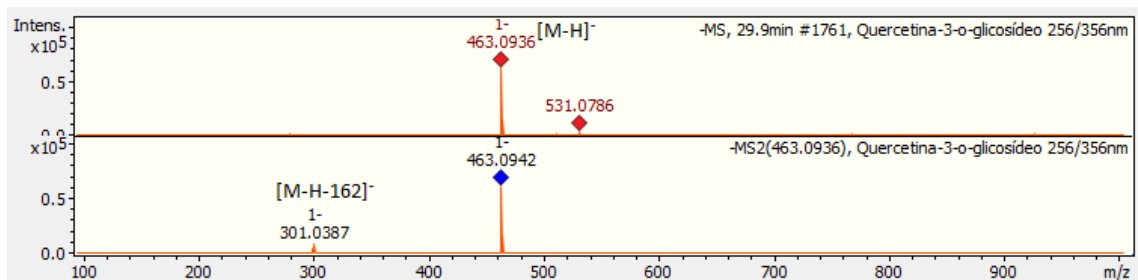
Fonte: própria autora.

Figura S44. Espectro de massas da apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo II no modo negativo.



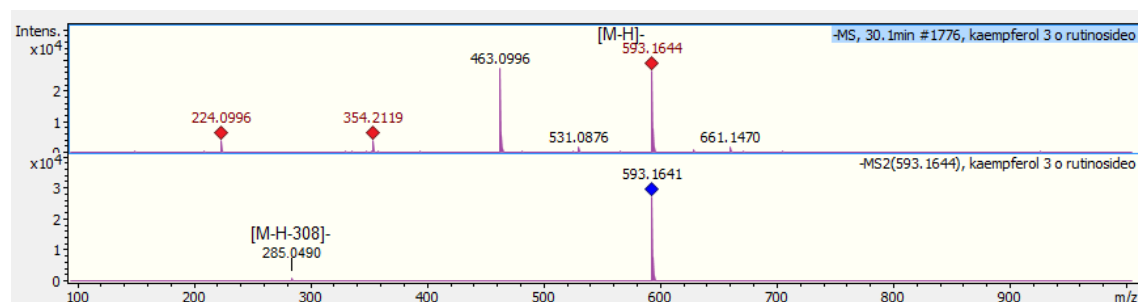
Fonte: própria autora.

Figura S45. Espectro de massas da quercetina-3-O-glicosídeo no modo negativo.



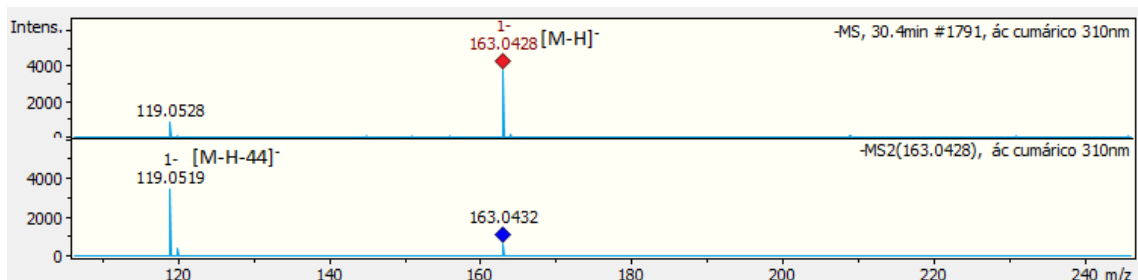
Fonte: própria autora.

Figura S46. Espectro de massas do kaempferol-3-O-rutinosídeo no modo negativo.



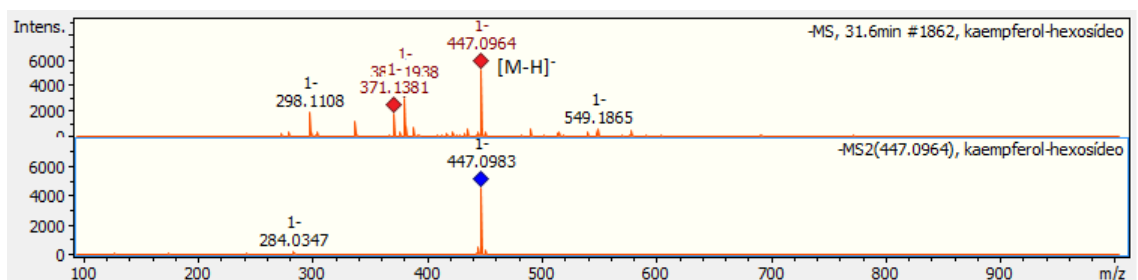
Fonte: própria autora.

Figura S47. Espectro de massas do ácido cumárico no modo negativo.



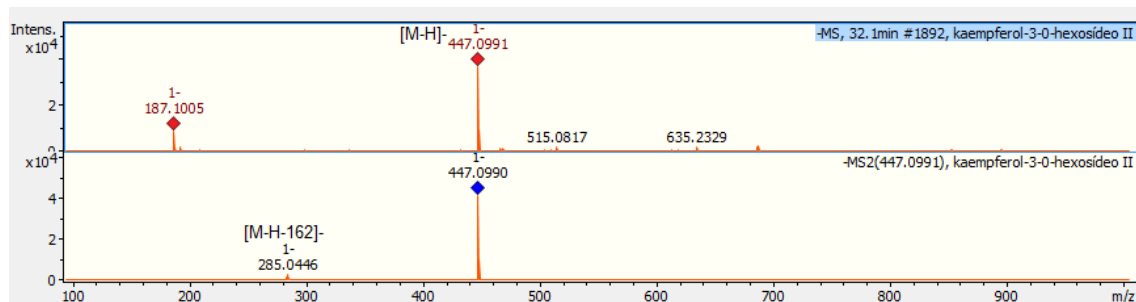
Fonte: própria autora.

Figura S48. Espectro de massas do kaempferol-hexosídeo I no modo negativo.



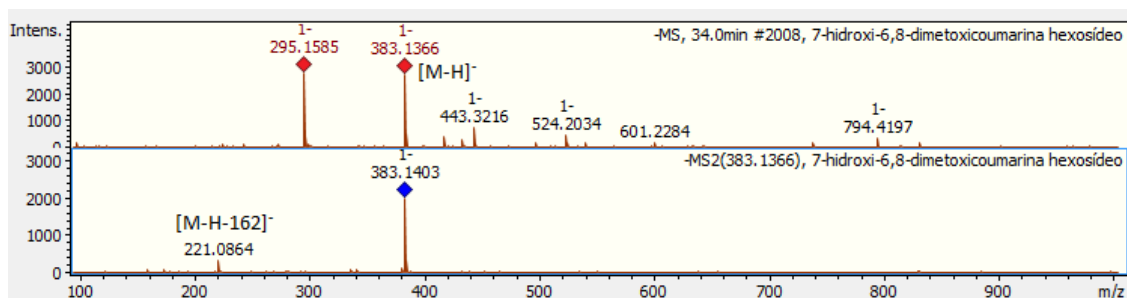
Fonte: própria autora.

Figura S49. Espectro de massas do kaempferol-hexosídeo II no modo negativo.



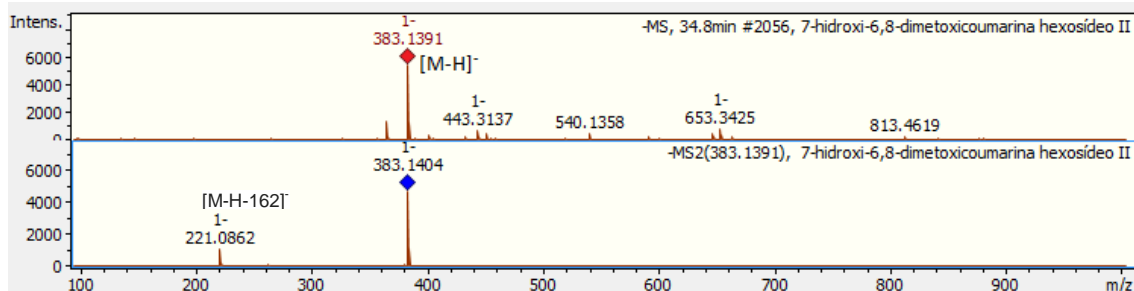
Fonte: própria autora.

Figura S50. Espectro de massas do isofraxidin hexosídeo I no modo negativo.



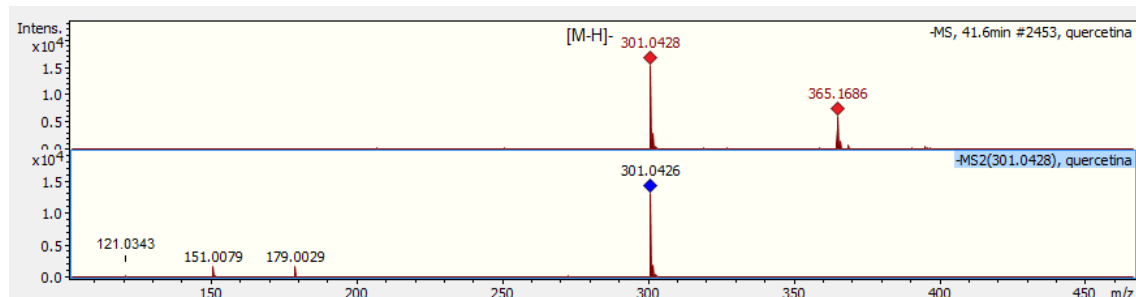
Fonte: própria autora.

Figura S51. Espectro de massas do Isofraxidin hexosídeo II no modo negativo.



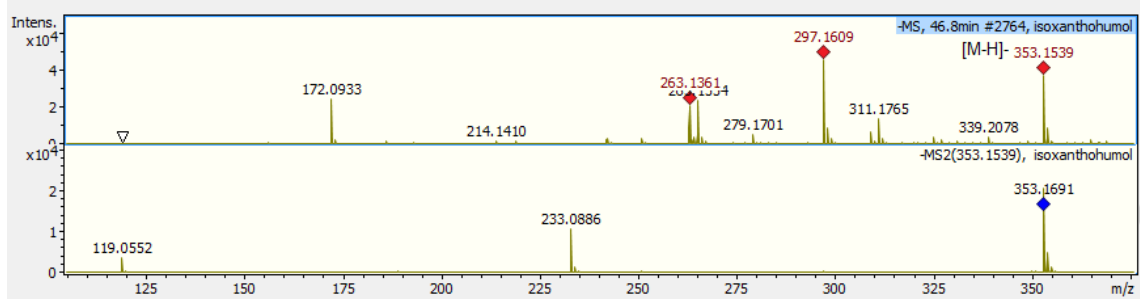
Fonte: própria autora.

Figura S52. Espectro de massas da quercetina no modo negativo.



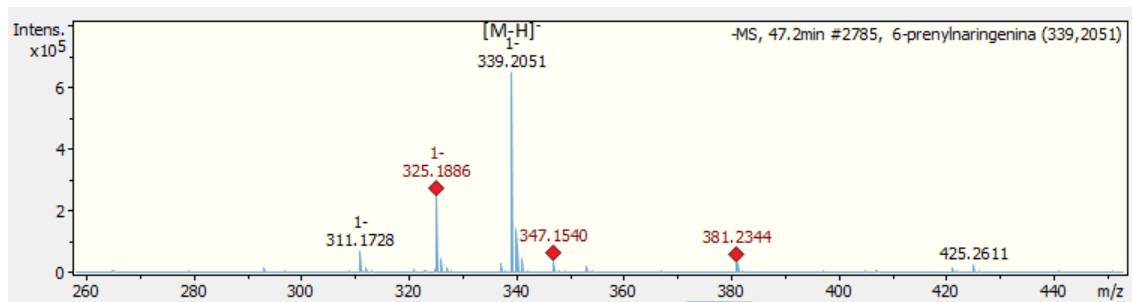
Fonte: própria autora.

Figura S53. Espectro de massas do isoxanthohumol no modo negativo.



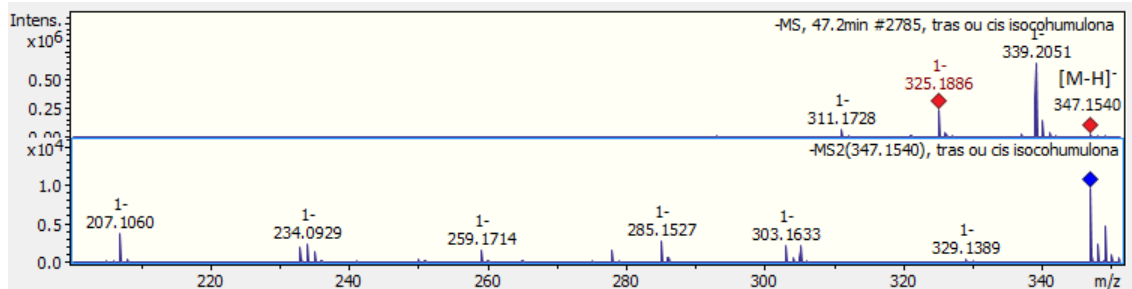
Fonte: própria autora.

Figura S54. Espectro de massas do 8-prenilnaringenina no modo negativo.



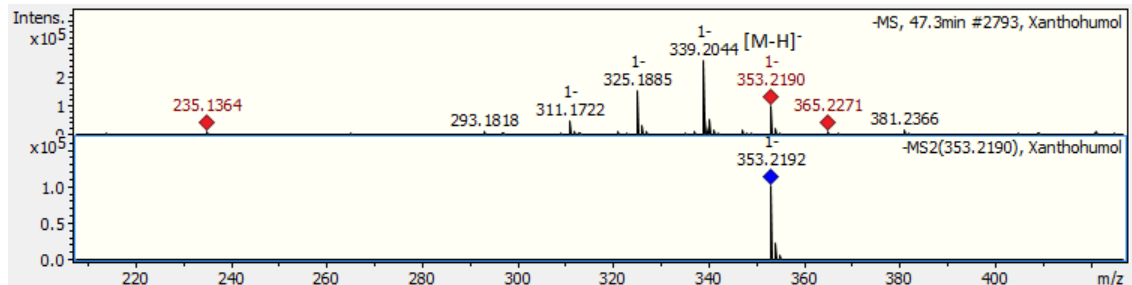
Fonte: própria autora.

Figura S55. Espectro de massas do isocohumulona no modo negativo.



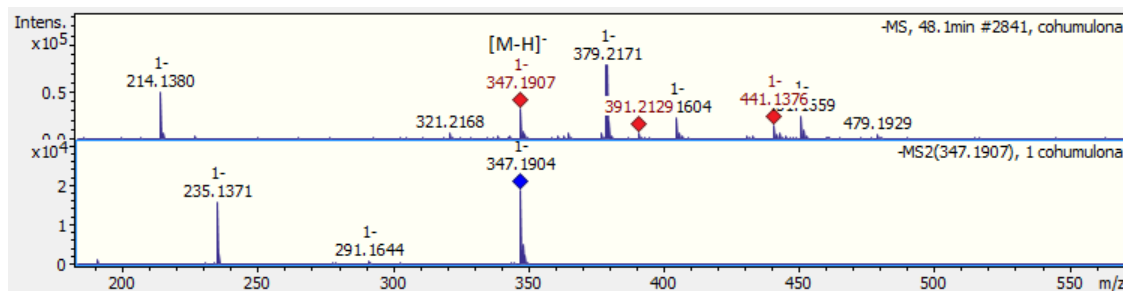
Fonte: própria autora.

Figura S56. Espectro de massas do xanthohumol no modo negativo.



Fonte: própria autora.

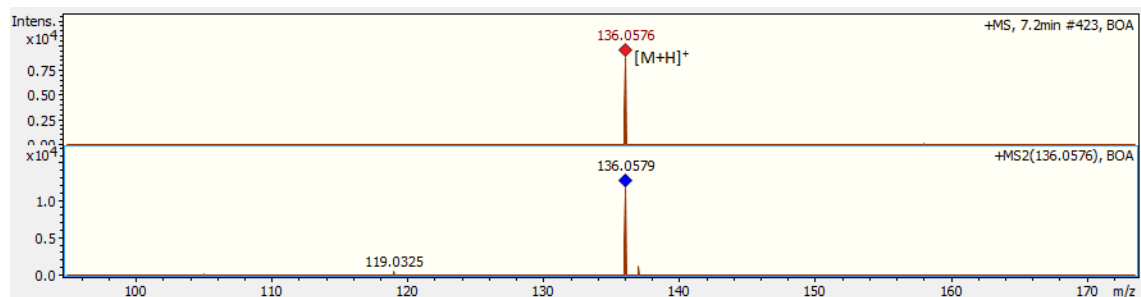
Figura S57. Espectro de massas da cohumulona no modo negativo.



Fonte: própria autora.

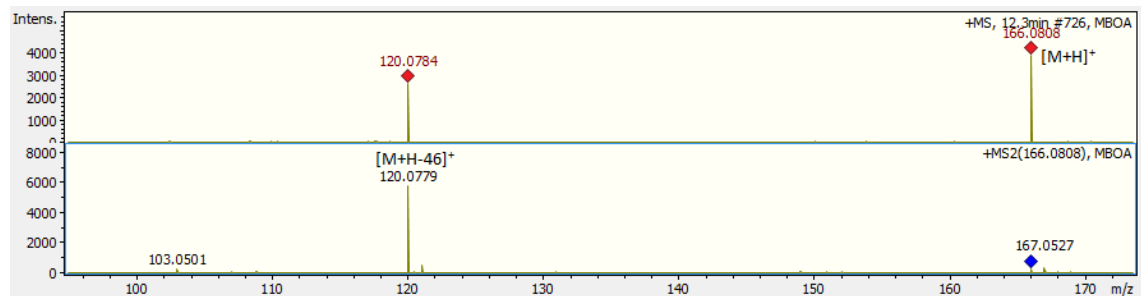
APÊNDICE B – Espectro de massas dos compostos nitrogenados

Figura S58. Espectro de massas do BOA no modo positivo.



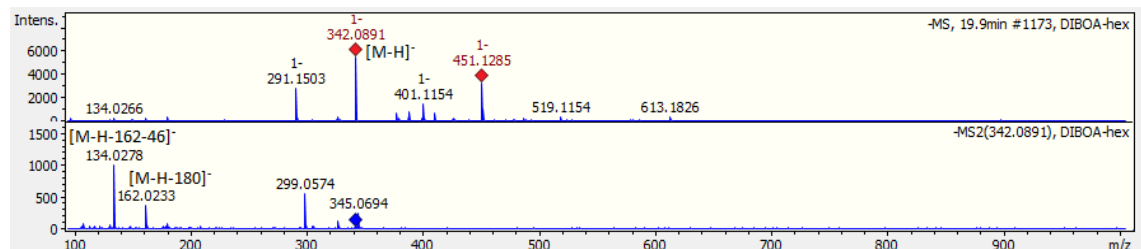
Fonte: própria autora.

Figura S59. Espectro de massas do MBOA no modo positivo.



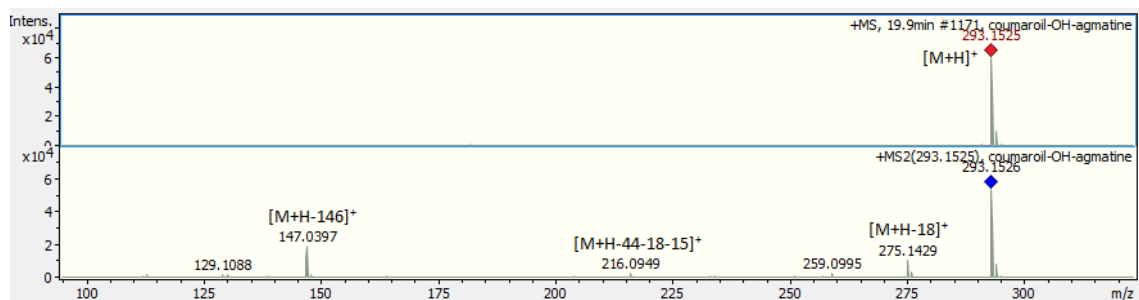
Fonte: própria autora.

Figura S60. Espectro de massas do DIBOA-hexosídeo no modo negativo.



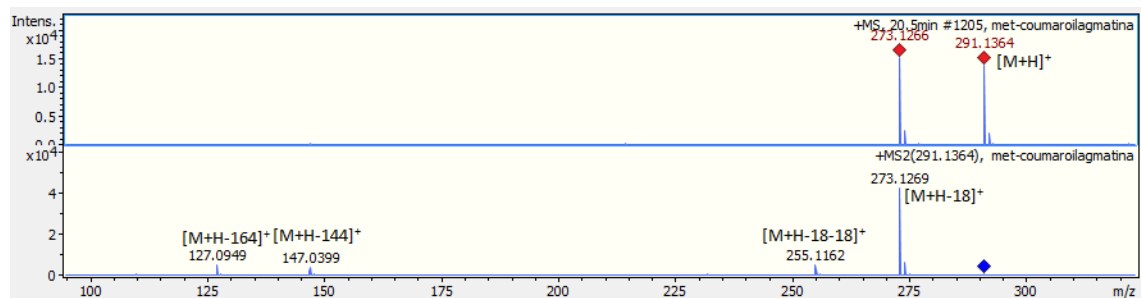
Fonte: própria autora.

Figura S61. Espectro de massas do coumaroil-hidroxi-agmatina no modo positivo.



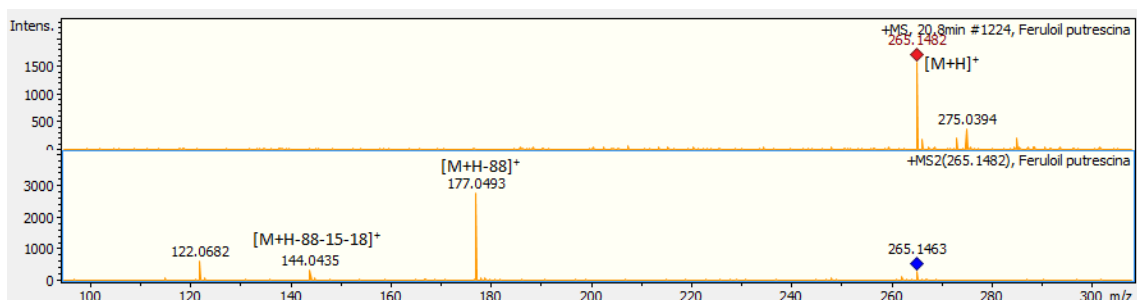
Fonte: própria autora.

Figura S62. Espectro de massas da met-cumaroilagmatina no modo positivo.



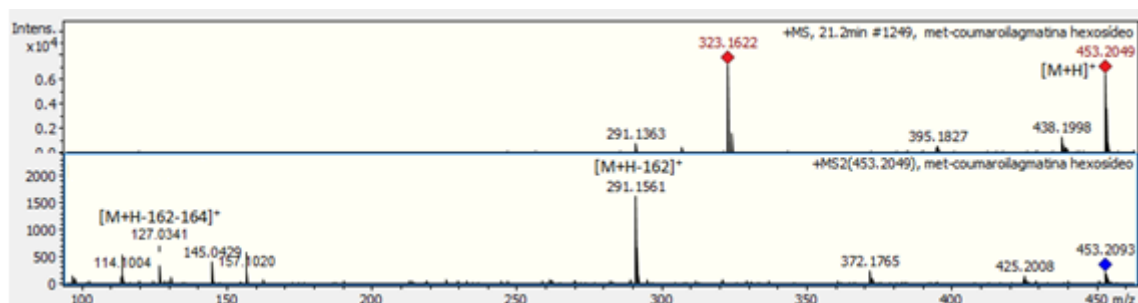
Fonte: própria autora.

Figura S63. Espectro de massas da feruioilputrescina no modo positivo.



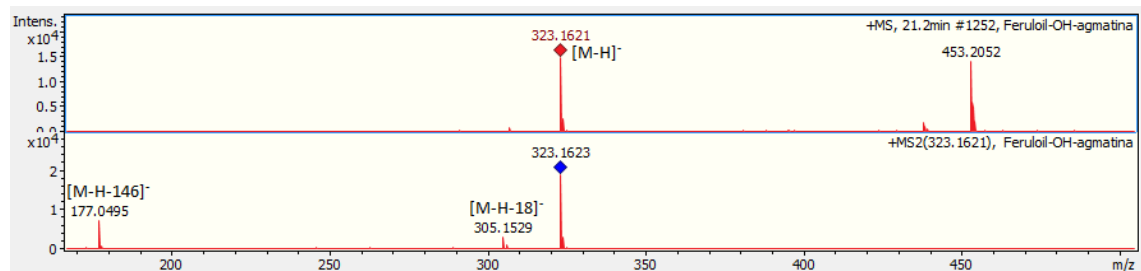
Fonte: própria autora.

Figura S64. Espectro de massas da met-cumaroilagmatina hexosídeo no modo positivo.



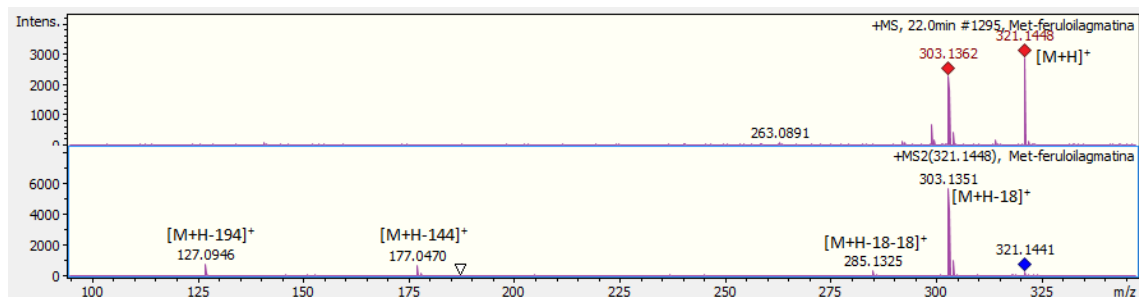
Fonte: própria autora.

Figura S65. Espectro de massas do feruioil-hidroxi-agmatina no modo positivo.



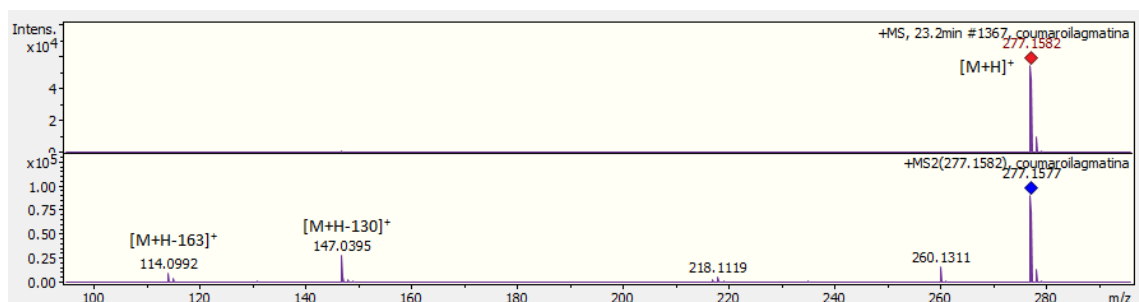
Fonte: própria autora.

Figura S66. Espectro de massas da met-feruloilagmatina no modo positivo.



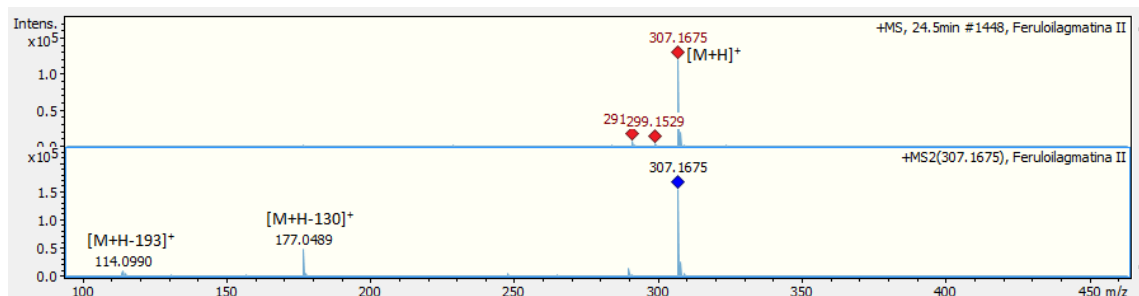
Fonte: própria autora.

Figura S67. Espectro de massas do cumaroilagmatina no modo positivo.



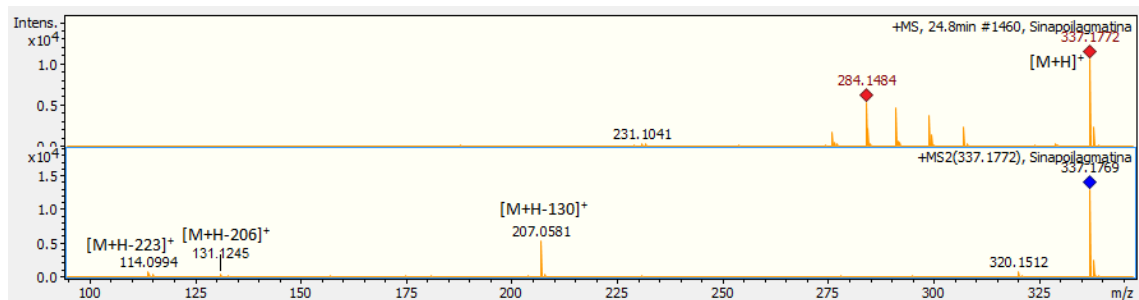
Fonte: própria autora.

Figura S68. Espectro de massas da feruloilagmatina no modo positivo.



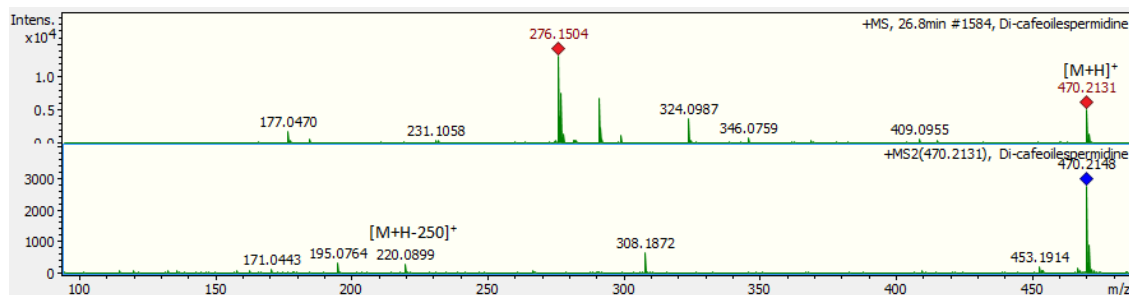
Fonte: própria autora.

Figura S69. Espectro de massas da sinapoilagmatina no modo positivo.



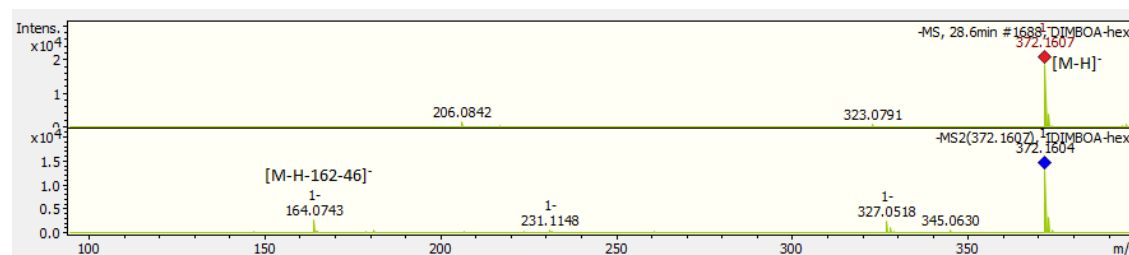
Fonte: própria autora.

Figura S70. Espectro de massas da di-cafeiolespermidina no modo positivo.



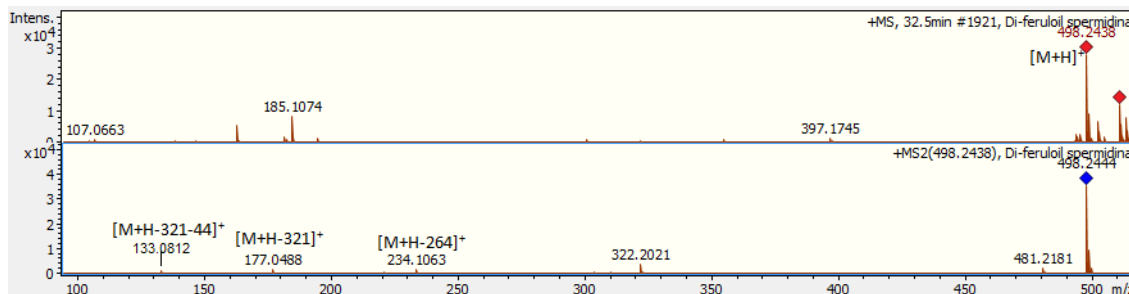
Fonte: própria autora.

Figura S71. Espectro de massas do DIMBOA-hexosídeo no modo positivo.



Fonte: própria autora.

Figura S72. Espectro de massas da di-feruiolespermidina no modo positivo.



Fonte: própria autora.

APÊNDICE C – Tabelas Suplementares

Tabela S1. Características cromatográficas e espectroscópicas dos padrões de compostos fenólicos obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Composto	t _R (min) ^a	λ _{max} (nm) ^b	Massa Exata	[M-H] ⁻	MS ² (-) (m/z) ^c
Ácido gálico	11,9	270	170,021	169,0291	124,0273
Ácido 5- cafeoilquínico	22,2	325	354,095	353,1191	191,0728
Ácido hidroxibenzóico	22,4	254	138,031	137,0448	93,0419
Catequina	22,8	279	290,079	289,0943	109,0443/ 123,0543 / 137,0287/ 151,0535/ 203,0873/
Epicatequina	24,7	278	290,079	289,0717	109,0390/ 123,0669 / 137,0287
Ácido caféico	24,7	322	180,042	179,0483	135,0571
Rutina	27,9	354	610,153	609,1836	300,0516 / 179,0134
Quercetina-3-O- glicosídeo	29,9	354	464,095	463,1384	300,0606 / 271,0574
Ácido cumárico	30,4	290	164,047	163,0515	119,0595
Ácido ferúlico	32,2	322	194,058	193,0800	178,0540/ 149,0796 / 134,0593
Quercetina	41,7	360	302,043	301,0632	107,0305/ 121,0399/ 151,0170/ 179,0135
Kaempferol	46,0	366	286,048	285,0701	n.d.
Isoxanthohumol	46,8	289	354,147	353,1888	233,1130 / 119,0661

Nota: ^aTempo de retenção em coluna Synergi C18 (4 μm). ^bSolvente: gradiente de 0,5% (v/v) de ácido fórmico em água e acetonitrila com 0,5% (v/v) de ácido fórmico. ^cIntensidade relativa do íons com maior abundância no MS² é mostradado em negrito. n.d.= não detectado.

Tabela S2. Compostos fenólicos presentes nos diferentes tipos de estilo de cerveja artesanal, obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

(continua)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																														
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3	
Ácido dimetoxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P	
Ácido 3,5-dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
Ácido gálico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
Ácido 2,5-dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Ácido 2,6-dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	P	P	P	A	P	A	A	A	P	P	P	A	P	P	A	P	P	
(Epi) Catequina hexosídeo I	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	

(continuação)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ1	MJ2	MJ3	TI1	TI2	TI3	FI1	FI2	FI3	DP1	DP2	DP3	FP1	FP2	FP3	TP1	TP2	TP3	DW1	DW2	DW3	FW1	FW2	FW3	TW1	TW2	TW3	CP1	CP2	CP3
2,4-Ácido dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
Ácido dimetoxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido 3-cafeoilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
(Epi) Galocatequina I	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido 2,3-dihidroxibenzóico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
(Epi) Catequina hexosídeo II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P
(Epi) Catequina hexosídeo III	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																														
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3	
(Epi) Galocatequina II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P
Ácido 3-p- cumaroilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ácido hidroxibenzóico I	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A
Proantocianidina B dímero	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Taxifolin hexosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Proantocianidina B dímero II	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A	A	A	A	P	A	A	P	
Ácido 5- cafeoilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	A	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

(continuação)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																														
	MJ1	MJ2	MJ3	TI1	TI2	TI3	FI1	FI2	FI3	DP1	DP2	DP3	FP1	FP2	FP3	TP1	TP2	TP3	DW1	DW2	DW3	FW1	FW2	FW3	TW1	TW2	TW3	CP1	CP2	CP3	
Ácido hidroxibenzóico II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	
Catequina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Ácido 3-feruloilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	P	P	A	A	P	P	P	A	P	A		
Proantocianidina B dímero III	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A	A	P	P	P	P	P	P	
Taxifolin hexosídeo II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A
Quercetina hexosídeo rutinosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A	A	P	P	A	A	A	A	
Proantocianidina B dímero IV	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A	A	A	A	P	A	P	P	

(continuação)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3
Epicatequina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido caféico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P
Apigenina-C-glicosídeo-C-pentosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Proantocianidina B dímero V	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ácido 4-p-coumaroilquínico	P	A	P	P	P	P	A	P	P	A	P	A	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Apigenina-C-hexosídeo-pentosídeo II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Quercetina di-hexosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A

(continuação)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3
Apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido 4-feruloilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P
Ácido cinâmico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A
Derivado de ácido cinâmico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	A	A	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	
Ácido 5-ferulilquínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P
Apigenina-6,8-C-diarabinosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

(continuação)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																														
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3	
Rutina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Apigenina-C-hexosídeo (vitexin ou isovitexin)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Apigenina-C-hexosídeo-O-hexosídeo II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	
Quercetina-3-O-glicosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Kaempferol-3-O-rutinosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Ácido cumárico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3
Kaempferol-3-O-hexosídeo I	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P	A	A	A	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A
Kaempferol-3-O-hexosídeo II	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Isofraxidin hexosídeo I	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A	P	A	A	A
Quercetina	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	A	A	P	P	A	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A
Isoxanthohumol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
8-Prenilnaringenina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Isocohumulona	A	P	P	P	P	A	P	A	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Xanthohumol	P	A	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Cohumulona	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P

Nota: P = compostos presentes; A = compostos ausentes.

Tabela S3. Compostos nitrogenados presentes nos diferentes tipos de estilo de cerveja artesanal, obtidos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

(continua)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ1	MJ2	MJ3	TI1	TI2	TI3	FI1	FI2	FI3	DP1	DP2	DP3	FP1	FP2	FP3	TP1	TP2	TP3	DW1	DW2	DW3	FW1	FW2	FW3	TW1	TW2	TW3	CP1	CP2	CP3
BOA	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	A	A	A	A
MBOA	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	A	A	A
DIBOA-hex	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Coumaroil-hidroxi- agmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Met- coumaroilagmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Feruloilputrescina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	P	A	P	P	P	P	P	P
Met- coumaroilagmatina hexosídeo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P

(conclusão)

Compostos	Tipos de cerveja artesanal																													
	MJ 1	MJ 2	MJ 3	TI 1	TI 2	TI 3	FI 1	FI 2	FI 3	DP 1	DP 2	DP 3	FP 1	FP 2	FP 3	TP 1	TP 2	TP 3	DW 1	DW 2	DW 3	FW 1	FW 2	FW 3	TW 1	TW 2	TW 3	CP 1	CP 2	CP 3
Feruloil-hidroxi- agmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Met-feruloilagmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Coumaroilagmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Feruliolagmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Sinapoilagmatina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Di- cafeoilespermidina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DIMBOA-hex	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Di- feruloilespermidina	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Nota: P = compostos presentes; A = compostos ausentes.