



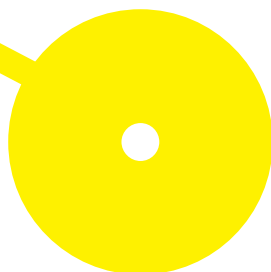
MESTRADO

FARMÁCIA – TECNOLOGIA DO MEDICAMENTO E DE PRODUTOS DE SAÚDE

# Cervejas Artesanais: Avaliação da Atividade Antioxidante e Potencial Utilização em Formulações Cutâneas

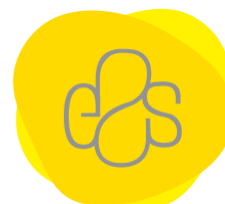
Maria João Sequeira Pereira

09/2024





ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



## **Cervejas Artesanais: Avaliação da Atividade Antioxidante e Potencial Utilização em Formulações Cutâneas**

**Autor**

Maria João Sequeira Pereira

**Orientadores**

Prof. Doutora Ana Isabel de Tavares Freitas de Oliveira, LAQV/REQUIMTE, Escola Superior de  
Saúde, Politécnico do Porto

Prof. Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, LAQV/REQUIMTE, Escola Superior de Saúde,  
Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de **Mestre em Farmácia –  
Tecnologia do Medicamento e Produtos de Saúde** pela Escola  
Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradecer às orientadoras, professora Dra. Ana Isabel Oliveira e professora Dra. Cláudia Pinho, pela distinta orientação científica, pelos ensinamentos e incentivos, pela disponibilidade e apreço.

Aos professores do ATC – Farmácia pelos ensinamentos transmitidos, indispensáveis à conclusão desta etapa. Particularmente ao professor Dr. Agostinho Cruz pela cordialidade e atenção.

À Diana, pela amizade e companheirismo dos últimos 6 anos, pela motivação e, por sempre acreditar em mim. Sem ti esta etapa não era tão bonita, nem animada.

À família por ser pilar basilar, particularmente ao meu irmão por acreditar em mim desde sempre, por me motivar a ser sempre mais e melhor e, pelo exemplo de resiliência.

Às Religiosas de Maria Imaculada por terem sido casa nos últimos anos, especialmente à Irmã Maria José Aguiar, Irmã Arantza, Irmã Elisabete, Irmã Sofia e Irmã Ana Isabel.

Às amigas, Carla, Filipa, Lara, Inês, Maria e Rita por serem o verdadeiro significado da palavra amizade.

## Resumo

A cerveja artesanal é uma matriz com potencial benefício cutâneo. Contudo, carece de evidência científica. Assim, pretende-se avaliar a atividade antioxidante, fotoprotetora e protetora (em células HaCaT), incorporando-se na cerveja artesanal mais promissora um extrato aquoso e etanólico (70% V/V) de *Prunus avium* Lapins. Da análise dos resultados, a cerveja ALM-IPA apresentou o maior teor de compostos fenólicos ( $8,96 \pm 0,64$  mg de equivalentes de ácido gálico/g), capacidade em neutralizar 50% dos radicais ABTS $\cdot^+$  ( $55,21 \pm 4,68$   $\mu$ g/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $23,54 \pm 1,53$   $\mu$ g/mL), o maior poder antioxidante da redução do ião ferro ( $53,74 \pm 1,27$   $\mu$ mol de equivalentes de trolox/g) e o maior fator de proteção solar ( $48,85 \pm 0,39$ ). Genericamente, as cervejas não apresentaram citotoxicidade até à concentração 250  $\mu$ g/mL após 24H e 48H de incubação. A incorporação de extratos de cereja apenas se revelou vantajosa no ensaio de pré-incubação com *tert*-butilhidroperóxido, garantindo ação comparável ao controlo positivo no extrato aquoso e, promovendo a diferenciação celular até à concentração 250  $\mu$ g/mL ( $p < 0,001$ ) no extrato etanólico. Em suma, constata-se os potenciais benefícios dos extratos de cerveja na pele, sendo essencial mais estudos para corroborarem as descobertas e garantirem a segurança dos extratos.

**Palavras-chave:** Cerveja Artesanal; Antioxidante; Fotoproteção; Queratinócitos; *Prunus avium* Lapins

## Abstract

Craft beer is a matrix with potential skin benefits. However, scientific evidence is lacking. The aim was therefore to evaluate the antioxidant, photoprotective and protective activity (in HaCaT cells) of incorporating aqueous and ethanolic extracts (70% V/V) of *Prunus avium* Lapins into the most promising craft beer. Analysis of the results showed that ALM-IPA beer had the highest content of phenolic compounds ( $8.96 \pm 0.64$  mg gallic acid equivalents/g), the ability to neutralize 50% of ABTS $\cdot^+$  radicals ( $55.21 \pm 4.68$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $23.54 \pm 1.53$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the highest antioxidant power from iron ion reduction ( $53.74 \pm 1.27$   $\mu\text{mol}$  of trolox equivalents/g) and the highest sun protection factor ( $48.85 \pm 0.39$ ). Overall, the beers showed no cytotoxicity until concentration of 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 24H and 48H of incubation. The incorporation of cherry extracts only proved advantageous in the pre-incubation test with *tert*-butylhydroperoxide, ensuring comparable action to the positive control in aqueous extract and promoting cell differentiation up to a concentration of 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0.001$ ) in ethanolic extract. Concluding, the potential benefits of beer extracts on the skin can be seen, but further studies are essential to corroborate the findings and guarantee the safety of the extracts.

**Keywords:** Craft beer; Antioxidant; Photoprotection; Keratinocytes; *Prunus avium* Lapins

## **I. Índice**

<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Cerveja</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Cerveja artesanal</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Processo de fabrico</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Matérias-primas</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.2.1</b>	<b>Água</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2.2</b>	<b>Malte</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2.3</b>	<b>Lúpulo</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.2.4</b>	<b>Levedura</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>Estilos de cerveja</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.4.</b>	<b>Composição das cervejas artesanais</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.5.</b>	<b>Inovação do fabrico de cervejas pela incorporação de extratos</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.6.</b>	<b>Cereja</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3.</b>	<b>Pele</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.1.</b>	<b>Consequências da exposição às radiações ultravioleta (UV)</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>Agentes fotoprotetores</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3.3.</b>	<b>Compostos Antioxidantes</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4.</b>	<b>Potencias benefícios de extratos de cerveja, matérias-primas e subprodutos do seu fabrico a nível cutâneo</b> .....	<b>32</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1.</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>46</b>
<b>3.2.</b>	<b>Obtenção das cervejas</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Tratamento prévio das cervejas</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3.</b>	<b>Análise química das amostras de cerveja</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Determinação do pH</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Teor de acidez</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>Teor de açúcares redutores (TAR)</b> .....	<b>48</b>

<b>3.4.</b>	<b>Determinação do TCF .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.</b>	<b>Determinação da capacidade antioxidante.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.1.</b>	<b>Ensaio do ABTS .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.2.</b>	<b>Ensaio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5.3.</b>	<b>Ensaio de determinação do valor de FRAP .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5.4.</b>	<b>Ensaio da atividade quelante de metais (ferrozina).....</b>	<b>51</b>
<b>3.6.</b>	<b>Ensaio de determinação do potencial fotoprotetor .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6.1.</b>	<b>Determinação do FPS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.6.2.</b>	<b>Capacidade de absorção UV.....</b>	<b>52</b>
<b>3.7.</b>	<b>Ensaio celulares .....</b>	<b>52</b>
<b>3.7.1.</b>	<b>Manutenção da linhagem celular .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.2.</b>	<b>Ensaio de avaliação da atividade metabólica .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7.3.</b>	<b>Incorporação dos extratos de cereja na cervejas artesanal mais promissora ....</b>	<b>54</b>
<b>3.7.4.</b>	<b>Obtenção e tratamento das cerejas .....</b>	<b>54</b>
<b>3.7.5.</b>	<b>Preparação do CA .....</b>	<b>54</b>
<b>3.7.6.</b>	<b>Preparação do CE.....</b>	<b>54</b>
<b>3.7.7.</b>	<b>Incorporação dos extratos de cereja na cerveja artesanal.....</b>	<b>54</b>
<b>3.7.8.</b>	<b>Ensaio de avaliação do efeito protetor da cerveja artesanal mais promissora isolada e após incorporação de extratos de cereja em células HaCaT, pelo ensaio de pré incubação.....</b>	<b>55</b>
<b>3.8.</b>	<b>Tratamento de dados .....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>Análise físico-química das cervejas .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.</b>	<b>TCF das cervejas.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3.</b>	<b>Atividade antioxidante.....</b>	<b>70</b>
<b>4.4.</b>	<b>Atividade fotoprotetora .....</b>	<b>77</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>FPS.....</b>	<b>77</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>Capacidade de absorção no ultravioleta .....</b>	<b>80</b>
<b>4.5.</b>	<b>Correlação entre os parâmetros físico-químicos, TCF, atividade antioxidante e fotoprotetora.....</b>	<b>84</b>
<b>4.6.</b>	<b>Atividade metabólica de células HaCaT inoculadas com extratos de cerveja ....</b>	<b>88</b>
<b>5.</b>	<b>Incorporação de extratos de <i>Prunus avium</i> Lapins na cerveja artesanal.....</b>	<b>94</b>

<b>5.1.</b>	<b>Análise físico da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja ....</b>	<b>94</b>
<b>5.2.</b>	<b>TCF da cerveja ALM-IPA após incorporação dos extratos de cereja .....</b>	<b>98</b>
<b>5.3.</b>	<b>Atividade antioxidante da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja</b>	<b>100</b>
<b>5.4.</b>	<b>Atividade fotoprotetora da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja</b>	<b>103</b>
<b>5.4.1.</b>	<b>FPS .....</b>	<b>103</b>
<b>5.4.2.</b>	<b>Capacidade de absorção no ultravioleta .....</b>	<b>104</b>
<b>5.5.</b>	<b>Atividade metabólica de células HaCaT após incorporação de extratos de <i>Prunus avium</i> Lapins.....</b>	<b>106</b>
<b>5.6.</b>	<b>Capacidade protetora da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja em células HaCaT .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>119</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>154</b>
<b>8.1.</b>	<b>Anexo 1 – Resultados complementares da atividade metabólica e protetora dos extratos em estudo em células HaCaT .....</b>	<b>154</b>
<b>9.</b>	<b>Apêndice.....</b>	<b>157</b>

## II. Índice de tabelas

Tabela 1 – Características ideais da água para o fabrico cervejeiro.....	6
Tabela 2 – Compilação dos potenciais benefícios de extratos de cerveja, matérias-primas e subprodutos do fabrico cervejeiro na pele.....	32
Tabela 3 – Características das cervejas incluídas no estudo.....	47
Tabela 4 – Valores normalizados resultantes da relação do efeito erimatogénico (EE) e a intensidade da radiação por comprimento de onda (I), necessário ao cálculo dos valores de FPS.....	52
Tabela 5 – Análise físico-química das cervejas em estudo.....	57
Tabela 6 – Teor de compostos fenólicos totais nas cervejas em estudo.....	67
Tabela 7 – Atividade antioxidante das cervejas, segundo os ensaios de ABTS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ferrozina e FRAP.....	71
Tabela 8 – Fator de proteção solar das cervejas.....	77
Tabela 9 – Capacidade de absorção no ultravioleta das cervejas em estudo.....	81
Tabela 10 – Correlação entre os parâmetros físico-químicos, TCF, atividade antioxidante e fotoprotetora.....	85
Tabela 11 – Análise química da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja....	95
Tabela 12 – Teor de compostos fenólicos totais (TCF) da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins (aquoso e etanólico).....	98
Tabela 13 – Atividade antioxidante da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins, segundo os ensaios de ABTS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ferrozina e FRAP.....	102
Tabela 14 – Fator de proteção solar da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins (aquoso e etanólico). ....	103
Tabela 15 – Capacidade de absorção no ultravioleta da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins.....	104

### III. Índice de figuras

Figura 1 – Mercado global das cervejas artesanais por região no período compreendido entre 2023–2030.....	3
Figura 2 – Etapas de produção de cerveja artesanal.....	4
Figura 3 – Diferentes colorações do malte consoante a temperatura de torra.....	7
Figura 4 – Estilos de cerveja.....	9
Figura 5 – Camadas e composição da pele.....	22
Figura 6 – Danos cutâneos decorrentes da exposição solar.....	24
Figura 7 – Radiação ultravioleta e, respetiva penetração cutânea.....	24
Figura 8 – Mecanismo de ação dos filtros solares orgânicos e inorgânicos.....	26
Figura 9 – Capacidade fotoprotetora do protetor solar tendo em conta o seu FPS.....	28
Figura 10 – Vantagens dos compostos antioxidantes de origem natural nos danos causados pelos radicais livres desencadeados pelas radiações UV.....	30
Figura 11 – Consequências do desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e o stress oxidativo.....	31
Figura 12 – Correlação entre a variação da cor da cerveja entre as escalas Standard Reference Method (SRM) e European Brewery Convention (EBC). .....	58
Figura 13 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com a cerveja ALM-IPA.....	89
Figura 14 – Influência da adição de extratos de cereja Lapins na cerveja ALM-IPA na cor. A: ALM-IPA. B: ALMP-IPA+ CA (ALMP-IPA após adição do extrato CA). C: ALM-IPA + CE (ALM-IPA após adição de CE).....	95
Figura 15 – Comparação da viabilidade celular de células HaCaT após incubação com a cerveja ALM-IPA e após incorporação de extrato aquoso de Prunus avium Lapins (ALM-IPA + CA) e extrato etanólico de Prunus avium Lapins (ALM-IPA + CE), após a) 24H e b) 48H de incubação.....	106
Figura 16 – Capacidade protetora, segundo o ensaio de pré-incubação, dos extratos da cerveja ALM-IPA e após a incorporação de extrato aquoso de Prunus avium Lapins (ALM-IPA + CA) e extrato etanólico de Prunus avium Lapins (ALM-IPA + CE) em células HaCaT.....	111
Figura 17 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Stout: a) cerveja EL-MS, b) cerveja EME-IS, e c) cerveja ALM-OS.....	154

Figura 18- Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo India Pale Ale: a) cerveja EL-IPA, b) cerveja DC-IPA. 154

Figura 19 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Pilsner: a) cerveja EL-P, b) cerveja M-P e c) cerveja S-P. .... 155

Figura 20 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Munich Dunkel: a) cerveja S-MD e b) cerveja B-MD.. 155

Figura 21- Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com extratos de Prunus avium Lapins: a) aquoso e b) etanólico. .... 156

Figura 22 - Capacidade protetora, segundo o ensaio de pré-incubação, dos extratos aquoso (CA) e etanólico (CE) de Prunus avium Lapins em células HaCaT.. .... 156

#### IV. Siglas e Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS <sup>•+</sup>	Radical do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ALM-IPA + CA	Cerveja ALM-IPA após incorporação de extrato aquoso de cereja ( <i>Prunus avium</i> Lapins)
ALM-IPA + CE	Cerveja ALM-IPA após incorporação de extrato etanólico (70% V/V) de cereja ( <i>Prunus avium</i> Lapins)
ATP	Adenosina Trifosfato
CA	Extrato aquoso de cereja ( <i>Prunus avium</i> Lapins)
CE	Extrato etanólico (70% V/V) de cereja ( <i>Prunus avium</i> Lapins)
DCF	Dihidrofluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
FPS	Fator de Proteção Solar
FRAP	Poder Antioxidante da Redução do Ião Férrico
GAE	Equivalentes de Ácido Gálgico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogénio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado a um Detetor de Díodos
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espetrometria de Massa em Tandem de Ionização por Eletropulverização
HPLC-DAD-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor de Matriz de Díodos Acoplada à Espetrometria de Massa por uma Fonte de Ionização por Eletropulverização
IBU	<i>International Bitterness Units</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inibir em 50%
IL-1	Interleucina-1

IL-6	Interleucina -6
IL-8	Interleucina - 8
MIC	Concentra Mínima Inibitória
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MRSA	Resistente à Meticilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NaOH	Hidróxido de sódio
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigénio
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RP- HPLC- DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa com Detetor de Matriz de Díodos
SRM	Standard Reference Method
TAR	Teor de Açúcares Redutores
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
TCF	Teor De Compostos Fenólicos
UFC	Unidades Formadoras De Colónias
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta - A
UVB	Ultravioleta - B
UVC	Ultravioleta - C
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## 1. Introdução

### 1.1. Cerveja

A Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro define cerveja como uma “bebida obtida por fermentação alcoólica, de um preparado a partir de água potável e de malte de cereais, por ação de leveduras, ao qual são adicionadas fibras de lúpulo e/ou derivados, cujos maltes de cereais (obtido a partir de grãos de cevada, trigo, ou outros cereais submetidos a um processo de maltagem) deverão corresponder a, pelo menos, 50% em massa do total das matérias-primas fontes de açúcares empregues” (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022).

Para a produção de cerveja podem ser adicionadas:

outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas como sejam os grãos crus ou açúcares, desde que esta adição não exceda 50% em massa do total das matérias-primas fontes de açúcares empregues; outros ingredientes destinados ao consumo humano, os quais devem obedecer à respetiva legislação específica ou, quando apropriado, autorizados em conformidade com a legislação relativa a novos alimentos, desde que esta adição não exceda 30% em volume do produto final; e culturas microbiológicas com perfil fermentativo não alcoólico durante o processo produtivo da cerveja (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022). Para além disso, “é proibida a substituição total de flores de lúpulo e seus derivados por outros princípios amargos; e é proibida a adição de álcool que não resulte de um processo de fermentação” (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022).

Dados da *Grand View Research* de 2021, avaliam o mercado mundial das cervejas em 680,9 biliões de dólares americanos, esperando-se uma taxa de crescimento de 7,0% no período de 2022–2030 (Grand View Research, 2022). No mesmo ano, o consumo anual *per capita* em Portugal foi de 48 L, aumentando para 53 L em 2022 (Luz, 2023).

A cerveja é composta por água, etanol, hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos (por exemplo, leucina, arginina e triptofano), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sais inorgânicos (por exemplo, potássio, cloreto e fosfato), azoto, ácidos orgânicos (ácido acético, láctico e succínico), álcoois superiores, aldeídos (acetaldeído), ésteres (acetato de etilo, acetato de isoamilo e nicotinato de etilo), enxofre, derivados do lúpulo e vitaminas (por exemplo, B1, B3 e B5) (Astrup et al., 2016; Buiatti, 2009; Jastrzebski et al., 2007). No entanto, o seu interesse crescente reside na sua composição em ácido vanílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico, gálhico, derivados da catequina, quercetina, kaempferol, derivados da apigenina, derivados da

cohumulona e humulona, que se reflete em potenciais benefícios para a saúde, não só em termos alimentares como cosméticos (Chen et al., 2014; Nardini & Garaguso, 2020; Quifer-Rada et al., 2015; Socha et al., 2017).

## **1.2. Cerveja artesanal**

A produção de cervejas tem sido alvo de inovação técnica e criativa, o que culminou no aparecimento das cervejas artesanais, cuja definição não se encontra contemplada na legislação portuguesa, podendo apresentar diferenças entre países (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022). Assim, a cerveja artesanal pode ser definida como aquela que é produzida à base de malte, água, lúpulo e levedura (matérias-primas de elevada qualidade), em quantidades reduzidas (produção inferior a 6 milhões de barris/ano nos Estados Unidos da América; inferior a 200 000 hectolitros/ano na Itália; e menor que 5000 hectolitros/ano no Reino Unido) em cervejarias independentes, segundo técnicas tradicionais (Brewers Association, n. d; IL Presidente della Republica, 1962; Maehle, 2021; Tirado-Kulieva et al., 2023; Villacreces et al., 2022).

Para além disso, é possível a adição de ingredientes inovadores, que lhes possam conferir características únicas, não só em termos organoléticos como em propriedades nutricionais e antioxidantes (Baiano, 2021; Breda et al., 2022; Capece et al., 2018; Horn et al., 2021; Maehle, 2021; Villacreces et al., 2022). As cervejas artesanais diferenciam-se das cervejas industriais pelo facto de, na sua maioria, não serem submetidas a processos de pasteurização e microfiltração, etapas cruciais na garantia da isenção de contaminações microbiológicas (Baiano, 2021; Censi et al., 2021; Maehle, 2021; Villacreces et al., 2022). Porém, a sua inexistência potencia os benefícios da cerveja artesanal, pois verifica-se, genericamente, a presença de um maior teor de compostos fenólicos (TCF) totais e maior atividade antioxidante nestas cervejas comparativamente com as industriais (Baiano, 2021; F. Rossi et al., 2021).

Dados da *Data Bridge Market Research* de 2022, avaliam o mercado mundial da cerveja artesanal em 2,77 biliões de dólares americanos, esperando-se que este atinja os 7,02 biliões de dólares americanos em 2030 (Figura 1) (Data Bridge Market Research, 2022). Dados do Grupo Marktest de 2021, estimaram 686 mil consumidores em Portugal (Marktest, 2022). Contudo e apesar de ser um mercado em expansão, o preço e a disponibilidade comercial das

cervejas artesanais são considerados fatores que constituem um entrave ao crescimento mais acentuado do seu mercado (Carvalho et al., 2018).

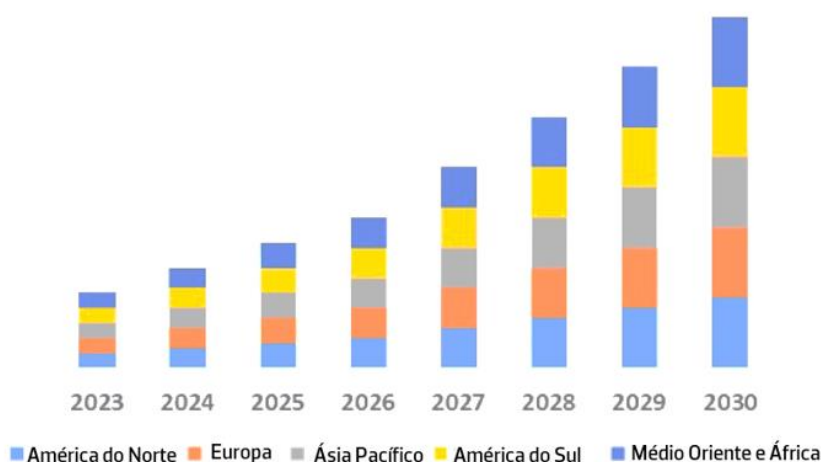


Figura 1 – Mercado global das cervejas artesanais por região no período compreendido entre 2023–2030. Adaptado de *Data Bridge Market Research*, (2022).

Apesar de mais dispendiosas, dada a qualidade das matérias-primas, o rigoroso processo de produção e as taxas tributárias, as cervejas artesanais cativam o consumidor pelos diferentes estilos disponíveis, pela exclusividade dos seus rótulos e/ou embalagens, estimulando, não só a visão como o olfato e paladar (Carvalho et al., 2018; Gómez-Corona et al., 2016; Jardim et al., 2018).

O consumo de cerveja artesanal prende-se com a perceção da sua maior qualidade e autenticidade em detrimento das cervejas industriais, sendo o seu consumo associado a ocasiões especiais (Aquilani et al., 2015; Gómez-Corona et al., 2016; Pokrivčák et al., 2019; Rosales et al., 2021).

As cervejas artesanais são, maioritariamente, consumidas por homens, com idades-compreendidas entre os 18 e os 35 anos, sendo os locais predominantes de consumo ambientes domésticos e estabelecimentos comerciais, como bares (Aquilani et al., 2015; Carvalho et al., 2018; Gómez-Corona et al., 2016)

Quanto ao estilo de cerveja artesanal mais apreciado pelos consumidores destaca-se o estilo Pale Ale, India Pale Ale, seguindo-se os estilos Pilsner e Weissbier, o que evidencia que as cervejas do tipo Ale sejam as mais apreciadas (Carvalho et al., 2018; Jardim et al., 2018). Tal é apoiado pelo estudo de *Data Bridge Market Research* de 2022 que prevê que as cervejas do estilo Ale dominem o mercado (Data Bridge Market Research, 2022).

### 1.2.1. Processo de fabrico

O processo de fabrico das cervejas artesanais pode apresentar algumas variações mediante os diferentes produtores e país (Figura 2).

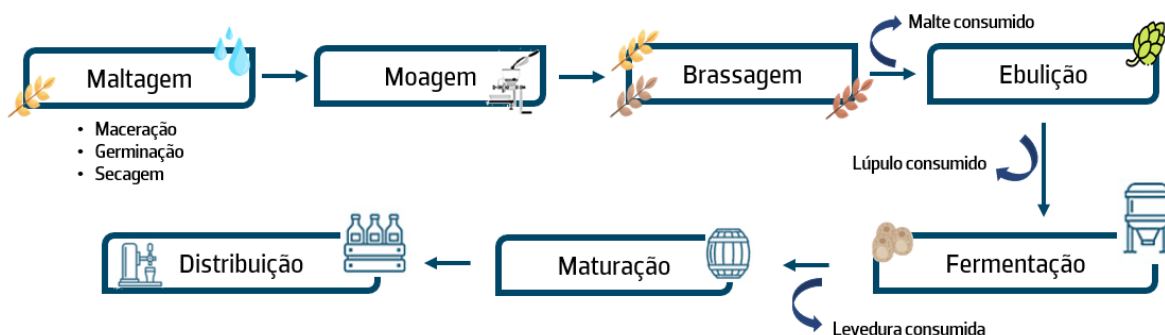


Figura 2 – Etapas de produção de cerveja artesanal. Adaptado de Cunha *et al.*, (2023) e Villacreces *et al.*, (2022), com ilustrações de *Biorender.com* e *Adobe stock.com*.

Inicia-se com a etapa de maltagem, na qual os grãos de malte em contacto com a água (maceração) germinam e nesta fase de crescimento tornam-se fonte de açúcares fermentáveis (Howe, 2020; Wunderlich & Back, 2009). O crescimento dos grãos de malte é interrompido com recurso a uma fonte de calor (secagem), inativando-se os processos enzimáticos (Howe, 2020). A temperatura de secagem condiciona o tipo e a cor do malte (Lukinac & Jukić, 2022).

Posteriormente, o malte é moído, promovendo o aumento da área de contacto e, consequentemente, a disponibilidade dos açúcares (Holbrook, 2020).

Segue-se a etapa de brassagem, que consiste na mistura, em proporções adequadas, de vários tipos de malte (de acordo com o tipo de cerveja a produzir) e água. Nesta fase, decorre a ativação de enzimas (proteases e amílases) (Thesseling *et al.*, 2019). As proteases garantem a degradação das proteínas, fonte de nitrogénio essencial às leveduras na etapa fermentativa (Thesseling *et al.*, 2019). As amílases hidrolisam as moléculas de amido, permitindo a disponibilidade de açúcares simples (maltose e glicose) (Thesseling *et al.*, 2019). Assim, forma-se um mosto (fração líquida resultante da mistura de malte com água) rico em hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerais, polifenóis, melanoidinas e furanos (Censi *et al.*, 2021; Holbrook, 2020; Horn *et al.*, 2021; Junior *et al.*, 2009).

De seguida, procede-se à clarificação do mosto, com o intuito de se eliminar o malte consumido (Holbrook, 2020). Na caldeira de ebulição, o mosto resultante é fervido, promovendo a sua esterilidade e a desnaturação/inativação de enzimas do malte ("Mash out")

(Holbrook, 2020; Maia et al., 2020; Thesseling et al., 2019). Além disso, esta etapa permite a aromatização, concentração e caramelização de açúcares (Junior et al., 2009). Durante o processo de aquecimento (100°C), o lúpulo é adicionado (Censi et al., 2021; Holbrook, 2020; Horn et al., 2021; Junior et al., 2009). A adição do lúpulo pode ocorrer de forma desfasada em momentos estratégicos da etapa de aquecimento, dado que esta pode induzir a perda de compostos voláteis (como óleos essenciais), responsáveis pelo aroma (Junior et al., 2009). Do processo de aquecimento resultam proteínas coaguladas, resíduos sólidos de lúpulo gasto, compostos amargos e outros resíduos designados por *trub*, os quais são removidos por centrifugação (clarificação do mosto) (Censi et al., 2021; Holbrook, 2020; Horn et al., 2021). Este procedimento é realizado tendo em conta o seu impacto na viabilidade da levedura, a qual também é sensível à temperatura (superior a 37°C), pelo que a etapa fermentativa é precedida por um processo de arrefecimento (Censi et al., 2021; Holbrook, 2020; Horn et al., 2021). A levedura a adicionar e a temperatura de fermentação são condicionadas pelo estilo de cerveja a produzir (Censi et al., 2021; Holbrook, 2020; Horn et al., 2021). Nesta fase, a levedura converte os açúcares em álcool (etanol) e CO<sub>2</sub> com a libertação de calor (Junior et al., 2009). Além disso, outros compostos podem ser sintetizados como é o caso de ácidos orgânicos, cetonas e ésteres (Junior et al., 2009). Nesta fase, a adição de oxigénio visa a sua utilização pelas leveduras na síntese de esteróis e ácidos gordos, essenciais à estrutura membranar durante o crescimento aeróbio e, por isso, promover a sua multiplicação (Holbrook, 2020; Junior et al., 2009). O produto resultante é centrifugado para remoção da levedura gasta (Censi et al., 2021).

Findo o processo de produção, a cerveja artesanal é engarrafada estando sujeita a um período de maturação (de 20 a 30 dias), ao fim do qual pode ser engarrafada e consumida (Censi et al., 2021; Horn et al., 2021).

### **1.2.2. Matérias-primas**

A cerveja artesanal é uma bebida funcional rica nutricionalmente dada à elevada qualidade das matérias-primas (malte, lúpulo, levedura e água) envolvidas no seu processo de fabrico (Villacreces et al., 2022).

### 1.2.2.1 Água

A água é o principal constituinte da cerveja, representando entre 90-94% do produto final (Buiatti, 2009). É fonte de iões (sulfato, cálcio, magnésio, cloreto, ferro) que condicionam o seu pH, o que, por sua vez, é fator condicionante do sabor (Howe, 2020). Algumas cervejas e estilos, inclusive, dependem de águas de regiões específicas para assegurarem as suas características, podendo ser necessário ajustes de pH e composição (Anderson et al., 2019; Cunha et al., 2023; Junior et al., 2009). Uma água ideal ao fabrico de cerveja deve atender às características presentes na tabela 1.

Tabela 1 - Características ideais da água para o fabrico cervejeiro (Junior et al., 2009).

Parâmetro	Especificação
Sabor	Insípida
Odor	Inodora
pH	6,5 - 8,0
Turbidez	< 0,4 NTU*
Matéria orgânica	0,0 - 0,8 mg de oxigénio/L
Sólidos totais dissolvidos	50 - 150 mg/mL
Dureza total	18/79 mg de carbonato de cálcio/L
Sulfatos	1 - 30 mg /L
Cloretos	1 - 20 mg /L
Nitratos	Ausente
Cálcio	5 - 22 mg /L
Magnésio	1 - 6 mg /L
CO <sub>2</sub> livre	0,5 - 5 mg /L

\* NTU - unidade de turbidez nefelométrica; CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

A água deve ser insípida e inodora de forma a não interferir nos parâmetros de sabor e aroma da cerveja, condicionantes de aceitabilidade (Junior et al., 2009). Além disso, ressalva-se a necessidade do seu pH estar compreendido entre 6,5-8,0, a fim das enzimas do malte poderem converterem o amido em açúcares fermentáveis (Junior et al., 2009).

### 1.2.2.2 Malte

A designação de malte é atribuída aos cereais que em contacto com água iniciam processos de germinação, formando-se o malte verde (Howe, 2020; Junior et al., 2009; Lukinac & Jukić, 2022). Este é capaz de desenvolver uma nova planta, sendo, por definição uma etapa onde as enzimas degradam o amido, aumentando o teor de açúcares (Howe, 2020;

Junior et al., 2009). Seguem-se as etapas de secagem, cuja temperatura é determinante para o tipo, cor e sabor do malte, dado que se pretende evitar a formação de cores e aromas indesejáveis por reações não enzimáticas, as reações de *Maillard* (Figura 3) (Howe, 2020; Lukinac & Jukić, 2022; Zhao, 2014). Assim, mediante o estilo de cerveja pretendido, os maltes são selecionados segundo a cor e sabor (Mwene-Mbeja, 2020).

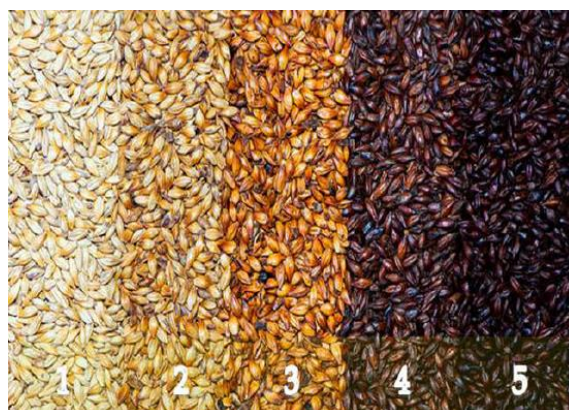


Figura 3 – Diferentes colorações do malte consoante a temperatura de torra (Lukinac & Jukić, 2022).  
1- Malte Pilsner; 2 – Malte Pale Ale; 3 – Malt Caramelo; 4 – Malt Chocolate; 5 – Malt Torrado

O malte constitui, assim, a principal fonte de hidratos de carbono (amido, açúcares fermentáveis e dextrinas não fermentáveis), polissacarídeos (celulose e  $\beta$ -glucanos), proteínas (proteínas coaguláveis e polipéptidos), lípidos (esteroides e ácidos gordos), polifenóis (principal fonte de polifenóis da cerveja, tais como: ácido gálico, ácido 4-dihidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido trans-*p*-cumárico e quercetina), melanoidinas, minerais e vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, piridoxina e colina) (Cortese et al., 2020; Holbrook, 2020; Howe, 2020; Lukinac & Jukić, 2022). Os açúcares fermentáveis são essenciais à etapa fermentativa do fabrico da cerveja, na qual os açúcares são convertidos em etanol e CO<sub>2</sub> (Holbrook, 2020; Howe, 2020).

As melanoidinas apresentam uma cor acastanhada, sendo responsáveis pela coloração do malte, formam-se durante as reações de *Maillard* inerentes à etapa de secagem/torrefação do malte (Zhao, 2014). Estas, encontram-se em maior concentração nas cervejas mais escuras comparativamente às claras (Zhao, 2014). Deste modo, a composição do malte tem um papel preponderante no sabor, na formação de espuma e na cor da cerveja, tendo impacto na classificação da mesma (Cunha et al., 2023). A cevada (*Hordeum vulgare*) pertence à família das gramíneas e constitui o principal malte utilizado na produção de cerveja (Howe,

2020). Uma cerveja cuja composição seja exclusiva em malte de cevada designa-se como cerveja de puro malte (Cunha et al., 2023). No entanto, podem ser adicionadas misturas de malte de cevada como maltes de trigo, centeio, arroz e milho (Buiatti, 2009; Cunha et al., 2023; Howe, 2020).

### 1.2.2.3 Lúpulo

As inflorescências femininas de lúpulo (*Humulus lupulus*) são adicionadas à cerveja como fonte de amargor, promovendo a conservação/estabilidade da cerveja (Buiatti, 2009; Howe, 2020).

Os  $\alpha$ -ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona) e os  $\beta$ -ácidos (lupulona, colupulona, adlupulona) presentes no lúpulo são os principais compostos responsáveis pelo amargor (Howe, 2020). Os  $\alpha$ -ácidos são os compostos mais amargos e, por isso, com maior influência no amargor da cerveja contribuindo para o maior valor de unidades internacionais de amargor (*International Bitterness Units* – IBU), onde 1 IBU é igual a 1 mg de  $\alpha$ -ácidos isomerizados/L (Burnham et al., 2018; Howe, 2020). Desta forma, o valor em IBU continua a ser muito utilizado para expressar o amargor do produto final (Calado et al., 2019).

O lúpulo possui, ainda, na sua composição, compostos aromáticos (linalol, geraniol, farneseno, humuleno) que, pela sua volatilidade, podem ser perdidos durante as etapas de fervura (Howe, 2020). Assim sendo, os maltes aromáticos (ricos em óleos essenciais) são adicionados após a fervura do mosto, a fim de se evitar perdas destes compostos (Thesseling et al., 2019). Por outro lado, os lúpulos (ricos em  $\alpha$ -ácidos), são adicionados ao mosto no início da fervura (Thesseling et al., 2019).

Apesar da composição em polifenóis ser maioritariamente conferida pelo malte, o lúpulo é responsável por cerca de 20% do teor total de polifenóis (Howe, 2020). O lúpulo apresenta na sua composição ácido gálgico, catequina, ácido clorogénico, ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 4-dihidroxibenzóico, epicatequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *trans-p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido sinápico, quercetina, isoxantohumol, 8-prenilnaringenina, xantohumol, cohumulona, humulona e lupulona (Cortese et al., 2020).

### 1.2.2.4 Levedura

As leveduras têm um papel preponderante na etapa fermentativa, onde transformam os açúcares do mosto em CO<sub>2</sub>, etanol e compostos voláteis (Anderson et al., 2019). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* são as espécies predominantemente utilizadas para o fabrico de cervejas de alta e baixa fermentação, respetivamente (Anderson et al., 2019).

Para além disso, a levedura pode condicionar parâmetros físico-químicos e funcionais da cerveja (Viana et al., 2021). Neste sentido, o estudo da etapa fermentativa é crucial na escolha da levedura que conferirá melhores características organoléticas e antioxidantes à cerveja (Viana et al., 2021). É exemplo a fermentação da cerveja American Pale Ale com a levedura *S. cerevisiae* US-05, que evidenciou maior potencial antioxidante, segundo o ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) com valores próximos de 1 mmol de trolox/ L e do ensaio do poder antioxidante da redução do ião férrico (FRAP) com valores próximos de 5 mmol de Fe<sup>2+</sup>/L) (Viana et al., 2021).

### 1.2.3. Estilos de cerveja

As cervejas podem ser classificadas em Ale, Lager e de fermentação espontânea, de acordo com o processo fermentativo inerente ao seu fabrico (Figura 4) (Cervejeiros de Portugal, n. d; Livens, 2016; Szweda, 2023; Tafulo et al., 2010).

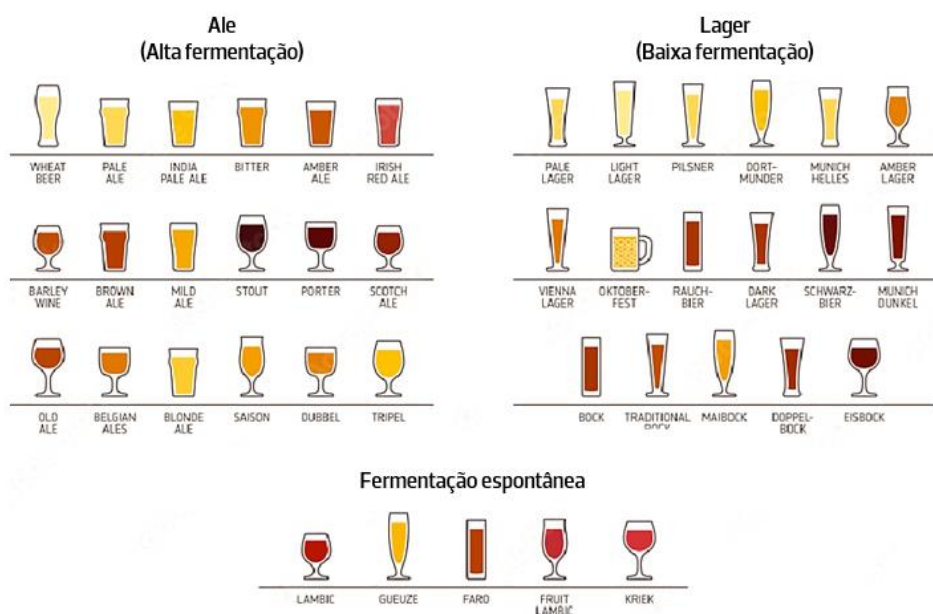


Figura 4 – Estilos de cerveja. Adaptado de Szweda (2023).

As cervejas do tipo Ale caracterizam-se por processos fermentativos mais rápidos (alta fermentação), decorrendo à temperatura entre os 15–25°C, sendo a *S. cerevisiae* a levedura usada na produção deste estilo (Cervejeiros de Portugal, n. d; Livens, 2016; Tafulo et al., 2010). Esta levedura, dada a sua tendência em flocular, acumula-se na superfície do tanque de fermentação, podendo a sua remoção não ser total (Livens, 2016). Os estilos Oatmeal Stout, Imperial Stout, Pale Ale e India Pale Ale são exemplos de cerveja do tipo Ale (Nothaft, 2003).

Por outro lado, as cervejas do tipo Lager resultam de processos fermentativos mais lentos (baixa fermentação), a temperaturas comparativamente inferiores (5–15°C) (Cervejeiros de Portugal, n. d; Livens, 2016; Tafulo et al., 2010). A *S. pastorianus* é a levedura associada ao etilo Lager, sendo removida pela sua capacidade de sedimentação nos tanques de fermentação (Livens, 2016). Os estilos Pilsner, Strong Lagers, Amber e Bock são exemplos do tipo Lager (Nothaft, 2003).

As cervejas de fermentação espontânea/ autónoma ou mista são cervejas de elevada complexidade que resultam da combinação de diferentes espécies de leveduras (Cunha et al., 2023; Maicas, 2020).

As cervejas podem, também, ser classificadas quanto ao teor de etanol, em cerveja sem álcool, quando o teor alcoólico é inferior a 0,5% vol.; cervejas com baixo teor de álcool, quando o teor de álcool esteja compreendido entre 0,5% e 1,2% vol.; cerveja corrente quando o teor alcoólico é superior a 1,2% vol. e extrato primitivo (extrato original – extrato do mosto de malte de origem da cerveja) inferior a 13° (expresso em graus de plato), cerveja especial quando o teor alcoólico é superior a 1,2% vol. e extrato primitivo compreendido entre 13° e 15°; e cerveja extra quando o teor alcoólico é superior a 1,2% vol. e extrato primitivo superior a 15° (Cervejeiros de Portugal, n. d; Decreto lei nº 6.871, de 4 de junho de 209, 2009; Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022).

Segundo a Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro a cerveja pode, ainda, ser classificada em “cerveja de ...” atendendo ao cereal em maior quantidade; “cerveja refermentada” quando a cerveja é submetida a uma refermentação, pela adição de levedura, antes do acondicionamento na embalagem final; e “cerveja refermentada em garrafa” quando é adicionada levedura à cerveja após o seu acondicionamento na embalagem final (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022).

#### 1.2.4. Composição das cervejas artesanais

A cerveja artesanal apresenta na sua composição proteínas, minerais (por exemplo, potássio, enxofre, fósforo e magnésio), açúcares (glicose, frutose, maltose, sacarose e maltotriose), ácidos orgânicos (por exemplo, ácidos tartárico, málico e succínico), vitaminas do complexo B (vitaminas B6 e B9), compostos voláteis (propanol, acetaldeído, e álcool isoamílico) e polifenóis (quercetina, ácido gálico, e ácido ferúlico) (Bortoleto et al., 2022; Černáa et al., 2023; Kunz et al., 2011; Pai et al., 2015; Poveda, 2019; Rinaldi et al., 2022; F. Rossi et al., 2021).

Relativamente à composição proteica das cervejas artesanais, foi identificada a presença por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) de aminoácidos livres como: o ácido L-glutâmico, L-arginina, e L-fenilalanina (Poveda, 2019).

Assim, a vasta composição em ingredientes ativos, confere à cerveja artesanal inúmeras potencialidades (Breda et al., 2022). Breda et al. (2022) analisaram a composição em compostos fenólicos de 24 cervejas artesanais portuguesas de diferentes marcas comerciais por cromatografia líquida e elevada eficiência de fase reversa com detetor de matriz de díodos (RP-HPLC-DAD), tendo sido identificada a presença de ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, luteolina, epicatequina, quercetina, kaempferol-3-*O*-glicosídeo e ácido *trans*-cinâmico.

Cheiran et al. (2019) estudaram a composição de cervejas artesanais brasileiras do estilo India Pale Ale, Weiss e Lager por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de matriz de díodos acoplada a espectrometria de massa por uma fonte de ionização por eletropulverização (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) identificando 57 compostos fenólicos (como, por exemplo, o ácido gálico, ácido cafeico, isoxanthohumol e 8-prenilnaringenina), dos quais 12 foram identificados pela primeira vez, como ácidos benzoicos (exemplo, ácido 2,4-dihidroxibenzóico), ácidos fenólicos conjugados (exemplo, ácido 3-*p*-cumaroilquínico, ácido ácido 3-feruloilquínico e ácido 4-feruloilquínico), flavonoides (exemplo, hexosido de taxifolina e dihexósido de quercetina).

Cortese et al. (2020) detetaram a presença de diversos compostos com potencial biológico, entre os quais a catequina, epicatequina, ácido *trans-p*-cumárico, quercetina, xanthohumol, cohumulona, humulona, colupulona, e lupulona em cervejas artesanais italianas (estilos Ego, Alter, Triplo Malto, Ubi, Fiat Lux e Major), por cromatografia líquida de alta

eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem de ionização por eletropulverização (HPLC–ESI–MS/MS).

Por sua vez, D. R. Marques et al. (2017) analisaram a composição de cervejas artesanais (estilos American Pale Ale, Brown Poter, Classic American Pilsner, Irish Red Ale) por cromatografia com detetor de matriz de díodos, constatando a presença de ácido gálgico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico.

Num outro estudo M. C. Silva et al. (2021) recorreram à cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de matriz de díodos (HPLC–DAD) para analisar 15 cervejas artesanais brasileiras identificando a presença de catequina, ácido cafeico, epicatequina, ácido *p*-cumárico, rutina hidratada, ácido *trans*-ferúlico, quercetina e formononetina.

Por fim Socha et al. (2017) estudaram nove cervejas comerciais tradicionais da República Checa, Alemanha e Polónia quanto à composição em compostos fenólicos tendo sido identificados o ácido gálgico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, quercetina e kaempferol.

#### **1.2.5. Inovação do fabrico de cervejas pela incorporação de extratos**

A cerveja consiste numa bebida funcional de interesse crescente dada a possibilidade de incorporação de algas, plantas medicinais, probióticos, cogumelos, frutos e outros compostos como café e própolis, que de forma genérica potenciam as suas atividades biológicas, sobretudo no que concerne à atividade antioxidante (Chacón–Figuroa et al., 2022; Cirilincione et al., 2023; Đorđević et al., 2016; Loh et al., 2021; Nardini & Garaguso, 2020; Nunes Filho et al., 2021; Taiti et al., 2023; Ulloa et al., 2017).

Nos últimos anos, são inúmeras as opções que foram colocadas no mercado integrando na sua composição extratos inovadores. Nardini & Foddai (2020) compararam cervejas contendo na sua composição noz, castanha, cacau, mel, chá verde, café e alcaçuz com cervejas convencionais, verificando que as cervejas contendo os diferentes extratos se destacavam pela maior atividade antioxidante, teor de polifenóis, flavonoides e ácidos fenólicos. Flavonoides (como a catequina, epicatequina, rutina, miricetina e quercetina) e o resveratrol foram encontrados nas cervejas com os extratos, encontrando-se ausentes nas cervejas convencionais (Nardini & Foddai, 2020).

A inovação na indústria cervejeira não só procura características organolépticas e atividades biológicas diferenciadoras, mas também atender à demanda de nichos

populacionais, como os doentes celíacos, com a produção de cervejas isentas de glúten. No estudo de Mayer et al. (2016), a cerveja maltada (com glúten) e cerveja de arroz (sem glúten) apresentaram semelhanças nas características organoléticas. Para além disso, Ceccaroni et al. (2019) estudaram a possibilidade de obtenção de maltes de arroz especiais (caramelo e torrado), passíveis de melhorar a cor e sabor das cervejas com malte de arroz. O malte de arroz torrado apresentou maior teor de polifenóis (variou de valores próximos a 1,5 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g a 2 mg de GAE/g), maior atividade antioxidante pelo ensaio ABTS (variou entre 0,5  $\mu\text{mol/g}$  e 1  $\mu\text{mol/g}$ ) e pelo ensaio do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (valores compreendidos entre 1  $\mu\text{mol/g}$  e 2  $\mu\text{mol/g}$ ) (Ceccaroni et al., 2019).

À semelhança dos vinhos, as cervejas artesanais têm sido alvo de processos de envelhecimento em barris, com o intuito de potenciar as suas características organoléticas. Neste sentido, Correia et al. (2023) estudaram a interação de cerveja artesanal (estilo Ale Lager, Porter) com lascas de cerejeira e de carvalho durante 30 dias, constatando, uma diminuição do teor de compostos voláteis (como, por exemplo álcoois, ésteres e acetatos), comparativamente às cervejas controlo (cervejas artesanais sem adição de lascas de madeira).

A incompatibilidade do consumo de álcool em atividades do dia a dia (por exemplo, condução de veículos e máquinas), durante a gravidez e toma de medicação, por práticas religiosas e pela consciência dos riscos na saúde impulsionou o mercado na criação de cervejas de baixo teor alcoólico e, até isentas, constituindo um desafio para a indústria, na garantia dos mesmos padrões de aceitabilidade (Salantă et al., 2020).

De igual forma, a preocupação incessante com o estilo de vida culminou na resposta da indústria cervejeira com a produção de cervejas *diet* com baixo teor em álcool e calorias e as cervejas *low-carb* com menor teor em carboidratos (Burberg & Zarnkow, 2009; Troilo et al., 2019).

Posto isto, estudos têm vindo a surgir com o intuito de se perceber se as cervejas que integram extratos inovadores na sua composição apresentam efetiva vantagem em detrimento das demais.

As algas têm sido promovidas a superalimentos pelo seu valor nutricional, apresentando alto teor proteico, vitaminas E, C, B12, minerais (tais como, potássio, cálcio, magnésio e selénio) (Grosshagauer et al., 2020). No artigo de Taiti et al. (2023) a incorporação de spirulina (*Arthrospira platensis*) a 0,25% melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade

antioxidante pelo ensaio ABTS. Para além disso, a cerveja com spirulina potenciou significativamente ( $p < 0,001$ ) a atividade citoprotetora de células H69 (colangiócitos intra-hepáticos humanos) contra os danos oxidativos desencadeados pelo *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH) em comparação com a cerveja artesanal sem a spirulina (Taiti et al., 2023).

No estudo de Santa et al. (2020) à cerveja artesanal adicionou-se à infusão de folhas desidratadas de alcachofra (*Cyanara scolymus*), selecionada pelo seus benefícios para a saúde (atividade colagoga, diurética, hepatoestimulante). A adição de alcachofra desencadeou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do TCF, comparativamente à cerveja artesanal sem alcachofra (Santa et al., 2020).

A incorporação de extratos de plantas medicinais *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Juniperus communis*, *Urtica dioica* e *H. lupulus* mostrou aumentar o TCF ( $p < 0,05$ ) e a atividade antioxidante ( $p < 0,05$ ) da cerveja artesanal em detrimento da cerveja comercial Lager, usada como controlo (Đorđević et al., 2016). A planta *M. officinalis* não só promoveu melhoria das propriedades antioxidantes como também melhorou as propriedades sensoriais da cerveja (média de pontuação de  $7,2 \pm 1,123$ ), comparativamente à cerveja comercial (média de pontuação de  $6,5 \pm 1,661$ ) (Đorđević et al., 2016).

A adição de extrato aquoso de alfavaca (*Ocimum selloi*) (0,1%) à cerveja artesanal após a etapa fermentativa resultou no aumento do TCF (de  $291,2 \pm 4,0 \mu\text{g de GAE}/\text{mL}$  para  $367,9 \pm 2,1 \mu\text{g de GAE}/\text{mL}$ ) e da atividade antioxidante (aumentou de  $45,1 \pm 0,2\%$  para  $69,0 \pm 0,8\%$ ), comparativamente à cerveja artesanal de estilo Pilsner antes da adição do extrato (Piva et al., 2021). Para além disso, as cervejas com o extrato mantiveram as suas características durante 90 dias de armazenamento (Piva et al., 2021).

Os probióticos definem-se como microrganismos vivos com benefícios à saúde do hospedeiro se administrados em quantidades adequadas (Guarner et al., 2023). Os seus benefícios resultam da melhoria da função intestinal pela ativação do sistema imunológico, digestão de alimentos, competição e eliminação de patógenos e atividade antioxidante (por eliminação de radicais superóxidos) (Guarner et al., 2023). A principal fonte de probióticos são os produtos lácteos. Contudo, a possibilidade de incorporação de probióticos nas cervejas permite o aporte destes compostos numa bebida não láctea, constituindo uma opção viável para consumidores que procurem este tipo de opções, devendo, se possível, salvaguardar ou potenciar positivamente as características organolépticas e nutricionais (Hinojosa-Avila et al., 2024).

A co-fermentação de *S. cerevisiae* var. *bouardii* (probiótico) com diferentes estirpes de *S. cerevisiae* (B2, C3, M4, MT-15, P4) na produção de cerveja artesanal resultou num aumento da atividade antioxidante (Capece et al., 2018). Para além disso, o número de células viáveis de *S. cerevisiae* var. *bouardii* variou entre  $8 \times 10^6$  e  $8 \times 10^7$  unidades formadoras de colónias/mL (UFC/mL), valor superior a  $10^6$ – $10^7$  UFC/mL, o necessário para efeitos probióticos benéficos (Capece et al., 2018).

A co-fermentação de *S. cerevisiae* WB-06 com *Lactocaseibacillus paracasei* Lpc-37 resultou num aumento da atividade antioxidante de valores próximos a 2,6 g de trolox/L para valores compreendidos entre 2,7 - 2,8 g de trolox/L ( $p < 0,05$ ) (Loh et al., 2021). A co-fermentação de *S. cerevisiae* CNCM I-3856 com *L. paracasei* Lpc-37 resultou num aumento do TCF de valores compreendidos entre 380 – 390 mg de GAE/L para valores entre 390 – 400 mg de GAE/L (Loh et al., 2021).

Nos últimos anos, o interesse por cogumelos medicinais tem vindo a aumentar pelas suas inúmeras propriedades, das quais se destacam a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (Venturella et al., 2021). Neste sentido, surgiu a possibilidade da adição do cogumelo *Pleurotus eryngii* na cerveja artesanal. A associação melhorou a viabilidade das leveduras durante o processo fermentativo, particularmente na adição do cogumelo antes da etapa fermentativa, por outro lado a cerveja controlo (sem adição do cogumelo) viu a viabilidade das leveduras diminuir a partir do quinto dia de fermentação (Cirlincione et al., 2023). Relativamente à avaliação sensorial, as cervejas que continham o cogumelo apresentaram sabor e aroma a cacau e cogumelo (Cirlincione et al., 2023). As cervejas cuja adição de cogumelo ocorreu antes da fermentação apresentaram um sabor mais envelhecido e as cervejas com adição à posteriori um sabor salgado e acético (Cirlincione et al., 2023). A cerveja com melhor avaliação resultou da adição de 5 g/L de cogumelo após a fermentação (Cirlincione et al., 2023). Adicionalmente, a presença do extrato induziu, nas cervejas, um aumento do teor alcoólico, do pH e intensificou a cor, quando comparadas à cerveja controlo (cerveja artesanal sem adição do cogumelo) (Cirlincione et al., 2023).

As especiarias encontram-se ligadas à culinária e à medicina há muitos anos, pela sua capacidade de conferir sabor e aroma aos alimentos, mas também, pelas propriedades medicinais, como antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Jiang, 2019). A curcuma (*Curcuma longa*), e a pimenta-negra (*Piper nigrum*) são dois exemplos de especiarias, cuja

adição combinada com lúpulo aromático (*H. lupulus*) durante o processo de fabricação de cervejas artesanais aumentou o TCF (passou de 298,01 mg de GAE/L para 288,21 – 300,00 mg de GAE/L) (Nunes Filho et al., 2021). Segundo o ensaio FRAP, a combinação dos extratos (395,01 – 423,00 mmol de trolox/L) revelou-se promissora, comparativamente à cerveja sem adição dos extratos (342,64 mmol de trolox/L), usada como controle (Nunes Filho et al., 2021). É de salientar que após um período de envelhecimento a diminuição do TCF e da atividade antioxidante foi maior no controle (cerveja sem adição dos extratos) que nas cervejas enriquecidas, podendo a vida útil das cervejas ter sido potenciada (Nunes Filho et al., 2021). Para além disso, os extratos não afetaram as características físico-químicas da cerveja (Nunes Filho et al., 2021).

O interesse por produtos derivados do mel reside na sua vasta composição fitoquímica que, particularmente, no caso da própolis lhe confere atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena (Ulloa et al., 2017). Desta forma, Ulloa et al. (2017) estudaram a influência da incorporação de extrato etanólico de própolis na cerveja artesanal no que concerne ao TCF, atividade antioxidante e impacto nas características físico-químicas. A incorporação do extrato de própolis resultou num aumento do TCF e do teor total de flavonoides comparativamente às cervejas artesanais sem adição do extrato ( $p < 0,05$  na concentração de 0,25 g/L) (Ulloa et al., 2017). Os parâmetros físico-químicas de cor e IBU não alteraram significativamente ( $p < 0,05$ ), o total de acidez apenas variou significativamente na incorporação de 0,25 g/L própolis ( $p < 0,05$ ), enquanto que o pH diminuiu após incorporação dos extratos em estudo ( $p < 0,05$ ) (Ulloa et al., 2017).

O café é uma das bebidas mais consumidas, gerando subprodutos (bagaço de café) durante a sua preparação. A composição do bagaço de café, essencialmente, em compostos fenólicos, vitamina E, minerais e proteínas, culminou no estudo da sua incorporação no fabrico de cerveja artesanal tipo Stout (Chacón-Figueroa et al., 2022). O bagaço de café induziu alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no TCF, no teor de flavonoides e na atividade antioxidante de cervejas artesanais. A concentração 1 mg/mL revelou-se a mais promissora em termos de TCF, teor de flavonoides e atividade antioxidante, podendo constituir uma forma de revalorização de resíduos (Chacón-Figueroa et al., 2022).

Nos últimos anos tem-se denotado o interesse na adição de frutas durante o processo de fabrico da cerveja pelo seu potencial contributo na composição fitoquímica e nas características organolépticas (Gasinski et al., 2020). A manga (*Mangifera indica*) é uma das

frutas exóticas mais consumidas, deste modo o estudo de Gasinski et al. (2020) teve por objetivo perceber o impacto da adição de diferentes extratos de manga (cerveja com sumo de manga, cerveja com polpa de manga, cerveja com manga crua, cerveja com manga crua homogeneizada com misturador e cerveja com manga homogeneizada com misturador sob aquecimento) no fabrico de cerveja quanto ao TCF, atividade antioxidante e características organoléticas. Em comparação com a cerveja controlo (sem adição de extratos de manga), a adição de manga conferiu à cerveja maior teor de polifenóis ( $p < 0,05$ ) e maior atividade antioxidante segundo os ensaios DPPH, FRAP e ABTS ( $p < 0,05$ ) (Gasinski et al., 2020). Os extratos de manga proporcionaram à cerveja melhores características sensoriais em comparação com a cerveja controlo ( $p < 0,05$ ) (Gasinski et al., 2020). Tendo em conta o aroma e sabor, a cerveja com incorporação de polpa de manga apresentou melhor pontuação que as demais (Gasinski et al., 2020).

Do consumo da beringela (*Solanum melogena*) resultam as cascas (sub-produto) que pelo seu potencial (atividade hepatoprotetora, anti-inflamatória e anticancerígena) podem conferir um aumento do valor biológico, da qualidade e do tempo de armazenamento da cerveja (Horincar et al., 2020). Deste modo, Horincar et al. (2020) tiveram como objetivo estudar o impacto da adição de extratos etanólicos de beringela em cerveja do tipo Pilsner. O TCF aumentou após a incorporação dos extratos de beringela, sendo igual a  $0,426 \pm 0,012$  mg de GAE/mL na cerveja controlo, aumentando consoante a concentração de extrato incorporado. Desta forma, a cerveja com 10 mg/mL apresentou maior TCF ( $0,631 \pm 0,003$  mg de GAE/mL) (Horincar et al., 2020). O potencial antioxidante foi estimado pelos ensaios DPPH e ABTS, e em concordância com o TCF a capacidade de neutralização dos radicais aumentou da cerveja controlo (no ensaio DPPH igual a  $77,706 \pm 0,899\%$  e no ensaio ABTS igual a  $57,288 \pm 0,371\%$ ) para a cerveja com maior concentração do extrato (igual a  $85,822 \pm 0,188\%$  no ensaio DPPH e  $80,019 \pm 3,167\%$  no ensaio ABTS) (Horincar et al., 2020).

Recentemente, têm surgido no mercado cervejas frutais, que incorporam durante o seu processo fermentativo frutas. Deste modo, Nardini & Garaguso (2020) no seu estudo tiveram por objetivo compararam as cervejas frutais comercializadas (cervejas com cereja, framboesa, pêssigo, damasco, uvas, ameixas, casca de laranja e maçãs) com as cervejas convencionais no que concerne ao teor de polifenóis e atividade antioxidante. Em termos físico-químicos as cervejas frutadas apresentaram maior teor alcoólico (variou entre 5,0 a 8,0%) e menor pH (variou entre 3,56 a 4,86), comparativamente às cervejas convencionais

(teor alcoólico variou entre 4,8 a 7,0 e o pH variou entre 3,64 e 4,87) (Nardini & Garaguso, 2020). As cervejas frutadas apresentaram maior teor de polifenóis (variou entre  $399 \pm 11$  mg de GAE/L a  $767 \pm 13$  mg de GAE/L) em detrimento das cervejas convencionais (variou entre  $321 \pm 9$  mg de GAE/L e  $482 \pm 10$  mg de GAE/L) (Nardini & Garaguso, 2020). Em concordância, as cervejas frutadas apresentaram maior potencial antioxidante segundo os ensaios FRAP ( $3,08 \pm 0,07$  mM de equivalente de sulfato ferroso a  $9,76$  mM de equivalente de sulfato ferroso) e ABTS (variou entre  $1,62 \pm 0,02$  mM de trolox a  $3,53 \pm 0,06$  mM de trolox) em comparação com as cervejas convencionais (valores FRAP variaram entre  $2,80 \pm 0,04$  mM de equivalente de sulfato ferroso a  $4,39 \pm 0,18$  mM de equivalente de sulfato ferroso e os valores de ABTS variaram entre  $1,55 \pm 0,06$  mM de trolox a  $2,03 \pm 0,04$  mM de trolox) (Nardini & Garaguso, 2020). De forma particular, a incorporação de cerejas na cerveja contribuiu para o maior teor de polifenóis ( $767 \pm 13$  mg de GAE/L quando da incorporação de 300 g/L de cerejas e  $747 \pm 8$  mg de GAE/L quando da incorporação de 200 g/L de cerejas) e de atividade antioxidante destas cervejas em detrimento das restantes ( $p < 0,05$ ) (Nardini & Garaguso, 2020).

### 1.2.6. Cereja

A cereja é o fruto da cerejeira, nome comum atribuído à espécie *Prunus avium*, caracterizada pela sua doçura e, por isso, conhecida, também, como cereja doce (Bastos et al., 2015). O principal produtor mundial de cereja é a Europa, nomeadamente a Espanha, Grécia e Itália (B. Gonçalves et al., 2022).

Em Portugal, a produção de cereja incide na região Norte, particularmente, entre Douro e Minho, Trás-os-Montes e Beira Interior (B. Gonçalves et al., 2022). O concelho de Resende (na região do Douro) assegura 30% da produção nacional, sendo detentor de um microclima ideal que confere características únicas às cerejas, as primeiras, anualmente, a surgir no mercado europeu (normalmente em meados de abril) (B. Gonçalves et al., 2022). Em Resende, as três variedades de cereja mais cultivadas são as cerejas Burlat, Van e Lapins (B. Gonçalves et al., 2022).

As cerejas apresentam como cor característica o vermelho. No entanto dependendo da variedade, estado de maturação e do teor de antocianinas a sua coloração pode variar entre rosa escuro e vermelho escuro (próximo de preto) (Hayaloglu & Demir, 2015). Genericamente, as cerejas mais escuras são mais doces e, apresentam maior teor de antocianinas,

comparativamente às cerejas mais claras (Kent et al., 2018). O peso das cerejas pode variar entre 6–8 g, sendo, também, influenciado pela variedade (Cao et al., 2015; Hayaloglu & Demir, 2015).

As cerejas são essencialmente constituídas por água, carboidratos, proteínas e gordura (Bastos et al., 2015). De entre os açúcares, Bastos et al. (2015) identificaram, por HPLC, a presença de frutose, glicose e sorbitol num extrato metanólico de cereja (80:20, V/V). No estudo de Cao et al. (2015) as variedades Santina e Black pearl (extrato etanólico 80% V/V), também, apresentaram, por HPLC, glicose e frutose na sua composição. No estudo de Hayaloglu & Demir (2015) foram analisadas as variedades de cereja Bing, Dalbasti, Duroña di Cesena, Lambert, Merton Late, Starks Gold, Van, Vista, 0–900 e Ziraat por HPLC-DAD, constatando-se a presença de glicose, frutose, sacarose e xilose.

Bastos et al. (2015) identificaram através de HPLC-DAD a presença de ácidos orgânicos em extrato metanólico (80:20, V/V) de cereja, tais como: ácido oxálico, ácido málico, ácido xiquímico e ácido fumárico. Nos seus estudos, Cao et al. (2015) constataram a presença de ácido málico e ácido xiquímico, segundo a técnica de HPLC em extratos etanólicos (80% V/V) de cereja das variedades Santina e Black pearl. Segundo o estudo de Hayaloglu & Demir (2015), as variedades de cereja Bing, Dalbasti, Duroña di Cesena, Lambert, Merton Late, Starks Gold, Van, Vista, 0–900 e Ziraat apresentaram na sua composição ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fumárico e ácido acético, tendo sido identificados por HPLC-DAD.

Em termos lipídicos, as cerejas são compostas por ácidos gordos polinsaturados, ácidos gordos saturados e ácidos gordos monoinsaturados (Bastos et al., 2015). Bastos et al. (2015) identificaram por cromatografia gasosa acoplado a um detetor de ionização por chama em maior concentração a presença de ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linoleico.

O potencial antioxidante das cerejas tem vindo a ser alvo de estudo, como é o caso do estudo de Hayaloglu & Demir (2015), onde 12 variedades de cereja apresentaram atividade antioxidante segundo o ensaio ABTS (variou entre  $4,49 \pm 0,04$  mg de trolox/g extrato fresco a  $6,15 \pm 0,04$  mg de trolox/g extrato fresco), o ensaio FRAP (variou entre  $0,44 \pm 0,08$  mg de trolox/g extrato fresco a  $1,61 \pm 0,12$  mg de trolox/g extrato fresco) e pelo ensaio DPPH (variou entre  $4,50 \pm 0,10$  mg de trolox/g extrato fresco a  $6,02 \pm 0,16$  mg de trolox/g extrato fresco). No estudo Cao et al. (2015) o potencial antioxidante das variedades Santina e Black Pearl foi

estimado pelo ensaio DPPH (igual a  $342,62 \pm 24,77$  mg de trolox/100 g extrato fresco e  $470,70 \pm 3,03$  mg de trolox/100 g extrato fresco, respetivamente) e FRAP (igual a  $249 \pm 8,01$  mg de trolox/100 g extrato fresco e  $182,03 \pm 7,90$  mg de trolox/100 g extrato fresco, respetivamente). No estudo de Bastos et al. (2015) a atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio DPPH (concentração capaz de inibir em 50% ( $IC_{50}$ ) =  $0,99 \pm 0,01$  mg/mL) e pelo poder redutor da conversão de  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$  ( $IC_{50}$  =  $0,57 \pm 0,01$  mg/mL). Tal atividade, pode estar correlacionada com a sua composição em compostos fenólicos totais, flavonoides e ácidos fenólicos (Bastos et al., 2015; Cao et al., 2015; Hayaloglu & Demir, 2015).

Bastos et al. (2015) estudaram a composição fenólica de extrato metanólico (80:20, V/V) de cereja por HPLC, denotando a presença de compostos como o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido *cis-p*-cumaroilquínico e quercetina-*O*-rutinósido-*O*-hexosídeo. Cao et al. (2015) através da HPLC-DAD detetou a presença de compostos como ácido neoclorogénico, ácido cumaroilquínico, ácido 4-cafeoilquínico e ácido clorogénico, em extratos etanólicos de cerejas da variedade Santana e Black Pearl. Matteo et al. (2016) procedeu à caracterização das cerejas das variedades New Star, Bertello, Del Monte, Della Recca, Malizia, Mulegnana Nera, Regina del Mercato e Silvestre por espectrofotometria de massa de elevada resolução, identificando compostos como o ácido neoclorogénico, procianidina (B1, B2, C1), catequina, ácido cumaroilquínico, ácido clorogénico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico, rutina, ácido ferúlico, isoquercetina, cianidina, quercetina, luteolina e kaempferol. As variedades de cereja Saco, Sweetheart, Satin e Maring apresentaram na sua constituição compostos como derivados do ácido hidroxibenzóico, catequina, derivados do ácido hidroxicinâmico, ácido cafeico, derivados do ácido *p*-cumárico, derivados da catequina e quercetina, identificados por HPLC-DAD, no estudo de A. C. Gonçalves et al. (2017).

Para além disso, as cerejas, ainda, possuem vitaminas na sua composição como a E e C (Bastos et al., 2015; Średnicka-Tober et al., 2019).

A sazonalidade das cerejas faz com que estas sejam consumidas predominantemente frescas. No entanto, estas podem ser alvo de processamento encontrando-se em caldas, preparações com álcool, frutas cristalizadas e compotas (Kent et al., 2018; Pilli et al., 2019).

Estudos têm surgido da inclusão de cerejas no fabrico de cerveja revelando aumento do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante, conferindo às cervejas melhores

características organolépticas comparativamente ao controlo (Nardini & Garaguso, 2020; Nedyalkov et al., 2023; Shopska et al., 2023).

Além disso, o estudo de Letsiou et al. (2021) com o objetivo de perceber os efeitos pleiotrópicos do extrato de *Prunus avium* sob fibroblastos dérmicos humanos (NHDF), apuraram ausência de efeitos citotóxicos dos extratos nas concentrações testadas (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL) durante 48H, através da análise dos níveis de adenosina trifosfato (ATP). As concentrações 0,1 µg/mL, 0,05 µg/mL induziram um aumento significativo dos níveis de ATP ( $p < 0,05$ ) (Letsiou et al., 2021). Além disso, a concentração 0,05 µg/mL conferiu capacidade de proteção das células NHDF contra o stress oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), denotando-se um aumento significativo dos níveis de ATP ( $p < 0,05$ ), comparativamente ao controlo negativo (células não tratadas) (Letsiou et al., 2021). Do estudo da expressão de glutathione peroxidase (GPX1), superóxido de dismutase (SOD1) e fator nuclear eritróide 2 (NRF2), envolvidos na resposta antioxidante, as células tratadas com o extrato após indução do stress oxidativo pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, viram a sua expressão aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ), em comparação com o controlo negativo, sugerindo um aumento potencial na resposta antioxidante (Letsiou et al., 2021). O extrato regulou positivamente ( $p < 0,05$ ) a expressão de colagénio tipo I alfa 1 (COL1A1), colagénio tipo III alfa 1 (COL3A1) e recetor CD44 na ausência e na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comparativamente às células não tratadas, indicativo da promoção da organização da matriz celular (Letsiou et al., 2021). Em concordância com o estudo dos níveis de ATP, o extrato aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e do fator de crescimento transformador beta 3 (TGFB3) na presença H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, elucidando o potencial proliferativo/reparador do extrato (Letsiou et al., 2021). Para além disso, o extrato na ausência e na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a expressão de interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) (Letsiou et al., 2021). A regulação positiva ( $p < 0,05$ ) dos genes sirtuína *sirt1* e *sirt2* e *foxo3* na presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conferindo ao extrato potencial ação antienvelhecimento (Letsiou et al., 2021). Desta forma, são previsíveis benefícios cutâneos da associação da cerveja artesanal com extratos de cereja, no que concerne ao potencial antioxidante, antienvelhecimento, anti-inflamatório e de organização da matriz extracelular.

### 1.3. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, apresentando como principal função a proteção do organismo contra fatores externos, como lesões mecânicas, térmicas e químicas, entrada de microrganismos e radiações ultravioleta (UV) (barreira física); a reparação e adaptação aquando de alterações de composição e estrutura por lesões ou stress; regulação da temperatura, água e eletrólitos (pelo isolamento e transpiração); síntese de vitamina D<sub>3</sub>; e a excreção de toxinas (ureia, amónia e ácido úrico) (Arda et al., 2014; Dabrowska et al., 2016; Dąbrowska et al., 2017; Khavkin & Ellis, 2011). Além disso, a pele possui mecanoreceptores e nociceptores que permitem a deteção de estímulos mecânicos de toque, vibração, pressão, temperatura, dor e prurido (Dabrowska et al., 2016; Khavkin & Ellis, 2011).

A pele é constituída por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 5).

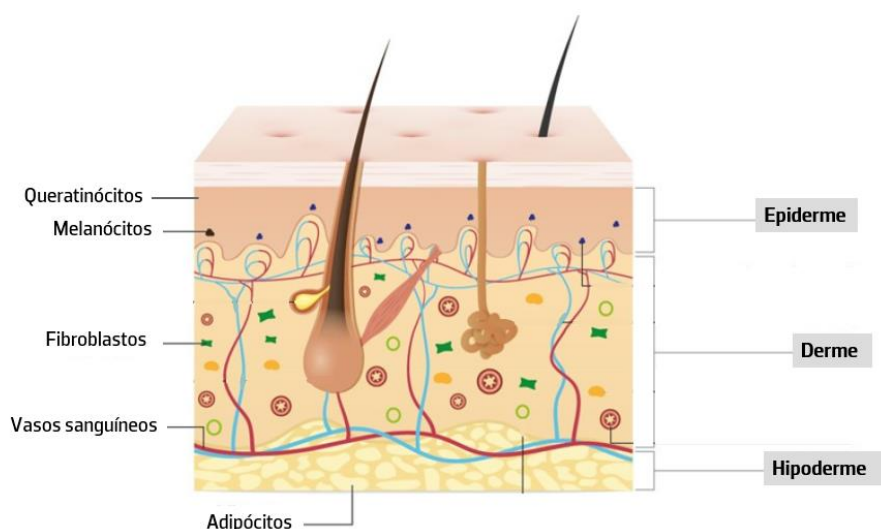


Figura 5 – Camadas e composição da pele. Adaptada de Hofmann *et al.*, (2023).

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo responsável pela função barreira (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022). Esta é composta por um epitélio escamoso, estratificado, queratinizado e avascular, maioritariamente constituído por queratinócitos (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022). Os melanócitos também fazem parte desta camada, sendo responsáveis por conferirem coloração à pele pela produção de melanina, o que permite a proteção das células vivas da epiderme contra os possíveis danos desencadeados pelas radiações UV (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022). Esta camada ainda é composta pelas

células de *Langerhans* responsáveis pela proteção imunológica, e pelas células de *Merkel* que funcionam como mecanoreceptores (Baroni et al., 2012). A epiderme pode ser dividida em cinco estratos: basal/ germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (da camada mais profunda para a mais superficial) (Betts et al., 2022).

A derme é principalmente constituída por tecido conjuntivo, fibras de colagénio, elásticas, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022). Esta camada é responsável pelo suporte mecânico e pelas propriedades elásticas da pele (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022).

A hipoderme é composta por tecido conjuntivo, tecido adiposo e vasos sanguíneos (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022). Esta camada confere propriedades de isolamento contra variações de temperatura, armazenamento de energia e proteção a choques mecânicos (Baroni et al., 2012; Betts et al., 2022).

### **1.3.1. Consequências da exposição às radiações ultravioleta (UV)**

As radiações UV são emitidas, essencialmente, pelo sol, apresentando benefícios como a síntese de vitamina D e  $\beta$ -endorfinas (Jesus et al., 2022; Nitulescu et al., 2023; WHO, 2022). No entanto, a exposição desprotegida da pele às radiações UV solares desencadeia a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) sendo a principal causa de danos cutâneos, como as queimaduras solares e o fotoenvelhecimento, hiperpigmentação e fotossensibilização (Figura 6) (Amaro-Ortiz et al., 2014; American Cancer Society, 2024; Baek & Lee, 2016; Gontijo & Gontijo, 2009; Jesus et al., 2022; Mota et al., 2019; WHO, 2022).

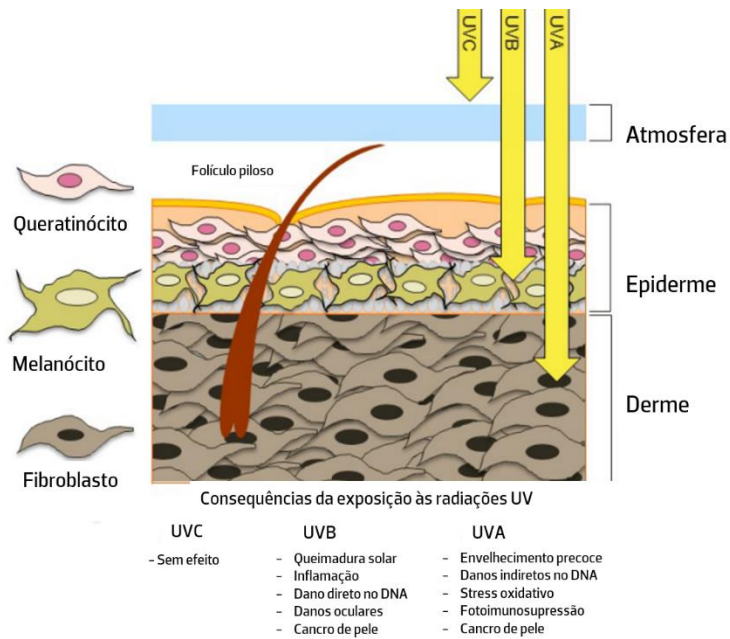


Figura 6 - Danos cutâneos decorrentes da exposição solar. Adaptado de Amaro-Ortiz et al. (2014).

A radiação UV divide-se em UVA, UVB e UVC, atendendo ao seu comprimento de onda, que influencia a profundidade de penetração a nível cutâneo (Figura 7) (Coelho et al., 2016; D’Orazio et al., 2013; Gontijo & Gontijo, 2009).

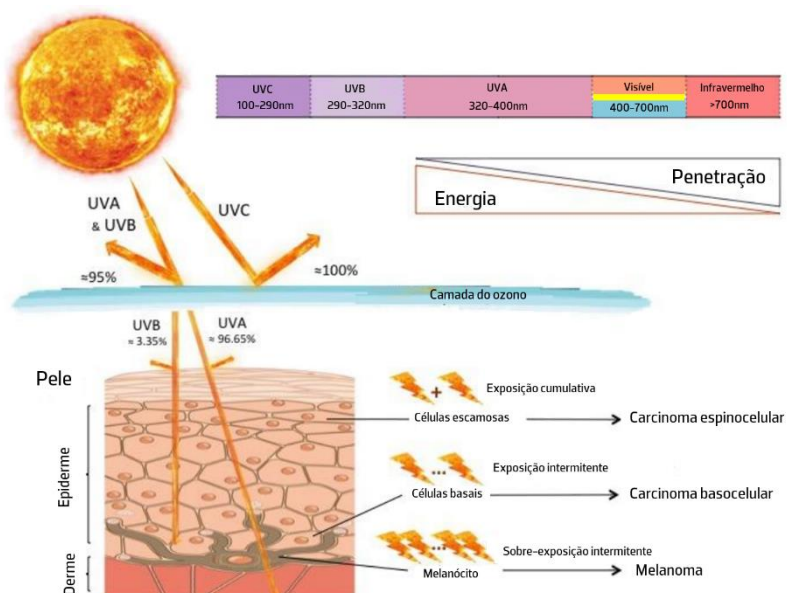


Figura 7 - Radiação ultravioleta e, respetiva penetração cutânea. Adaptada de Coelho et al. (2016).

A radiação UVA (320 – 400 nm) penetra a pele em profundidade, atingindo a derme, ativa os agentes fotossensibilizantes endógenos e, conseqüentemente a produção de ROS (D’Orazio et al., 2013; Gontijo & Gontijo, 2009). É responsável pelos efeitos cutâneos nefastos de longo prazo, como: fotoenvelhecimento, fotoimunossupressão e fotocarcinogênese (Gontijo & Gontijo, 2009; Jusvick et al., 2022). O carcinoma basocelular, espinocelular e o melanoma são as formas mais comuns de cancro cutâneo (Geoffrey et al., 2019).

Por sua vez, a radiação UVB (290 – 320 nm) atinge a epiderme, sendo responsável pelos efeitos nefastos de curto prazo, destacando-se a formação de eritemas, as reações de fototoxicidade e de fotoalergia (Gontijo & Gontijo, 2009; Jusvick et al., 2022; Mohania et al., 2017).

A radiação UVC (100 – 290 nm) é a que apresenta menor comprimento de onda, pelo que é totalmente retida pela camada do ozono, não atingindo a superfície terrestre (Geoffrey et al., 2019; Gontijo & Gontijo, 2009). A incidência das radiações UVA e UVB na superfície da Terra é dependente da latitude, altitude, estação do ano e hora do dia (Gontijo & Gontijo, 2009; WHO, 2022).

Assim, denota-se a importância de se utilizarem agentes fotoprotetores, dos quais são exemplo os compostos antioxidantes, a fim de se reduzirem os riscos supramencionados inerentes à exposição dos raios UVA e UVB, dada a correlação entre a exposição solar e a carcinogênese, evidente pelos dados da Organização Mundial da Saúde de 2020, onde a exposição solar causou 1,2 milhões de novos casos de cancro cutâneo (Gontijo & Gontijo, 2009; WHO, 2022).

### **1.3.2. Agentes fotoprotetores**

Um produto cosmético define-se como “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspecto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais” (Regulamento (CE) N.º1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos, 2009). De entre os produtos cosméticos disponíveis destacam-se, neste contexto, os protetores solares (Regulamento (CE) N.º1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos, 2009).

Segundo a Regulamentação Europeia n.º 647/2006 de 22 de setembro, um protetor solar é um produto cosmético que se destina a aplicação tópica com o intuito de proteger a pele contra os danos desencadeados pela exposição solar, prevenindo as queimaduras solares, os danos associados ao envelhecimento cutâneo e à fotoimunossupressão (Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, 2006). Assim, um protetor solar deve conferir proteção contra as radiações UV pela sua capacidade em absorver, refletir e dispersar estas radiações (Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, 2006). Idealmente, estes devem ser de amplo espectro conferindo proteção contra as radiações UVA e UVB (Gabros et al., 2023; Mancuso et al., 2017).

Os filtros UV podem ser classificados em filtros orgânicos e inorgânicos. Os filtros orgânicos (ou químicos) absorvem a radiação UV e transformam-na em energia térmica, emanada pela pele (Figura 8) (Geoffrey et al., 2019; Nitulescu et al., 2023).

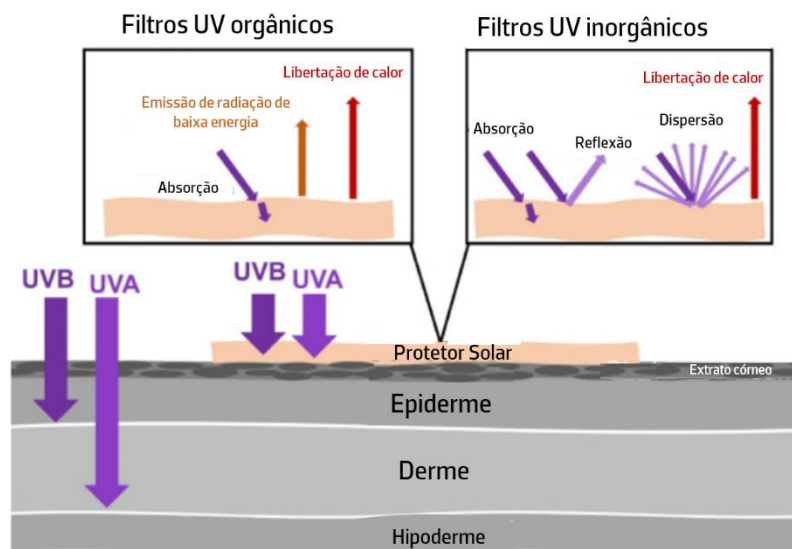


Figura 8 – Mecanismo de ação dos filtros solares orgânicos e inorgânicos. Adaptado de Zou et al. (2022).

A possível absorção sistêmica dos filtros orgânicos traduz-se em maior probabilidade de reações adversas, apesar da sua maior aceitabilidade em termos de aplicação, comparativamente aos filtros inorgânicos (Geoffrey et al., 2019). Os filtros orgânicos dividem-se em filtros UVA (como, por exemplo, benzofenonas, avobenzona), filtros UVB (como por

exemplo, derivados do ácido para-aminobenzoico, cinamatos, salicilatos) e filtros de largo espectro (como, por exemplo, ecamsule, silatriazole) (Geoffrey et al., 2019; Nitulescu et al., 2023). Os filtros inorgânicos (também denominados físicos ou minerais) operam como barreira física proporcionando a reflexão e dispersão da radiação UV, caracterizando-se pela alta fotoestabilidade e reduzida absorção sistémica, o que minimiza a probabilidade de reações adversas (Geoffrey et al., 2019; Schalka & dos Reis, 2011). De entre os filtros inorgânicos destaca-se o óxido de zinco e o dióxido de titânio (Latha et al., 2013). Em termos comerciais, os protetores solares podem combinar filtros orgânicos e inorgânicos aliando as duas formas de proteção contra as radiações UV (Zou et al., 2022).

Assim, um filtro solar ideal é aquele que é inerte, seguro, fotoestável, compatível com os restantes componentes da formulação, que permita boa espalhabilidade, que seja resistente à água, inodoro, que confira proteção de amplo espectro e não apresente ação sistémica (Geoffrey et al., 2019).

De acordo com a Regulamentação Europeia n.º 647/2006 de 22 de setembro apenas compostos com um fator de proteção solar (FPS) superior a 6 conferem proteção contra as radiações UV (Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, 2006).

O FPS define-se, então, como a relação entre a dose mínima eritematosa da pele protegida por um protetor solar da dose mínima eritematosa de uma pele desprotegida (Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, 2006). Deste modo, o FPS representa a capacidade de um protetor solar proteger a pele do aparecimento de eritema, em comparação com uma exposição desprotegida (Schalka & dos Reis, 2011).

Os protetores solares podem conferir proteção baixa ( $6 < \text{FPS} < 10$ ), média ( $15 < \text{FPS} < 25$ ), alta ( $30 < \text{FPS} < 50$ ) e muito alta ( $\text{FPS} = 50+$ ) (Latha et al., 2013; Schalka & dos Reis, 2011). Assim, à medida que aumenta o valor de FPS denota-se a diminuição da radiação UV que tem ação sobre a pele (Figura 9) e, conseqüentemente a probabilidade de danos inerentes a esta ação (Ngoc et al., 2019).

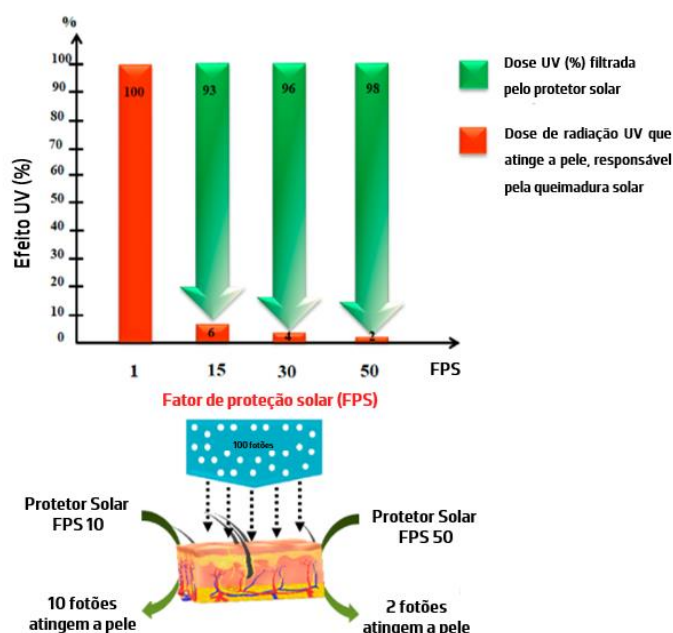


Figura 9 – Capacidade fotoprotetora do protetor solar tendo em conta o seu FPS. Adaptado de Ngoc et al. (2019).

No entanto, a eficiência do protetor está dependente de variáveis pessoais, ambientais e de utilização, como resposta eritematogénica individual, índice UV, horário de exposição solar, tipo de solo e aplicação (quantidade e reaplicação) (Schalka & dos Reis, 2011).

A fotoinstabilidade, a possibilidade de desencadear reações alérgicas, o impacto ambiental e a toxicidade humana (dada a deteção de filtros em seres marinhos e em amostras biológicas humanas) constituem desafios na utilização de filtros UV sintéticos (Geoffrey et al., 2019; Jesus et al., 2022; Latha et al., 2013). Desta forma, os compostos naturais apresentam-se como uma alternativa, dado que as plantas encontram-se expostas diariamente à radiação solar e, em resposta produzem metabolitos secundários que lhes permitem resistir aos danos despoletados (Jesus et al., 2022). Compostos como os terpenóides, flavonoides e ácidos fenólicos, caracterizados pelo seu potencial antioxidante, têm sido associados à capacidade fotoprotetora (Jesus et al., 2022).

### 1.3.3. Compostos Antioxidantes

Os compostos antioxidantes definem-se como qualquer substância que, em quantidades reduzidas, tenha a capacidade de prevenir ou retardar a oxidação de substratos facilmente oxidáveis (ácido desoxirribonucleico – DNA, lípidos e proteínas) (Atta et al., 2017). A ação antioxidante pode advir da inibição de enzimas oxidantes, pela queilação de iões

metálicos e neutralização de ROS pela doação de átomos de hidrogénio ou de eletrões (Atta et al., 2017; Baek & Lee, 2016).

Os antioxidantes podem ser endógenos ou exógenos, mediante sejam intrínsecos ao organismo, como os complexos enzimáticos (exemplos: glutathione peroxidase, glutathione transferase, superóxido de dismutase e a catalase) ou sejam obtidos pela alimentação (exemplo: as vitaminas e derivados, compostos nitrogenados não proteicos, cofatores, minerais, compostos organossulfurados, carotenoides, flavonoides e outros compostos fenólicos) (Baek & Lee, 2016; Carochó & Ferreira, 2013).

Quanto à origem, estes podem classificar-se como sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são obtidos por reações de síntese, sendo os mais comuns o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (Gülçin, 2012). A utilização destes tem vindo a ser restringida pela possível associação a efeitos tóxicos e carcinogénicos, apesar de conferirem uma atividade antioxidante média/alta e serem mais económicos (Atta et al., 2017; Gülçin, 2012). Os antioxidantes naturais são extraídos de produtos naturais (plantas). Apesar de mais dispendiosos e da sua atividade antioxidante ser menor comparativamente com os antioxidantes sintéticos, estes são selecionados pela sua inocuidade (Gülçin, 2012). Para além disso, o consumidor tem demonstrado maior interesse pelos antioxidantes naturais, por estes serem associados ao maior benefício para a saúde (Mitterer-Daltoé et al., 2021). Tal facto, tem despoletado um interesse crescente pelos investigadores, bem como inúmeros estudos no sentido de se descobrirem novas alternativas (Caleja et al., 2016; Delanghe et al., 2021; Gülçin, 2012; Gülçin et al., 2009), o que releva a importância e pertinência do presente trabalho.

De entre os compostos antioxidantes de origem natural destacam-se os flavonoides (como, por exemplo, quercetina, isoflavonas, proantocianidinas e antocianidinas), ácidos fenólicos (como, por exemplo, ácidos benzóico, gálhico e cinâmico), polifenóis (resveratrol), carotenoides (como, por exemplo,  $\beta$ -carotenos, licopeno, luteína) e vitaminas (C e E) com atividade fotoprotetora descrita (Figura 10) (Petruk et al., 2018).

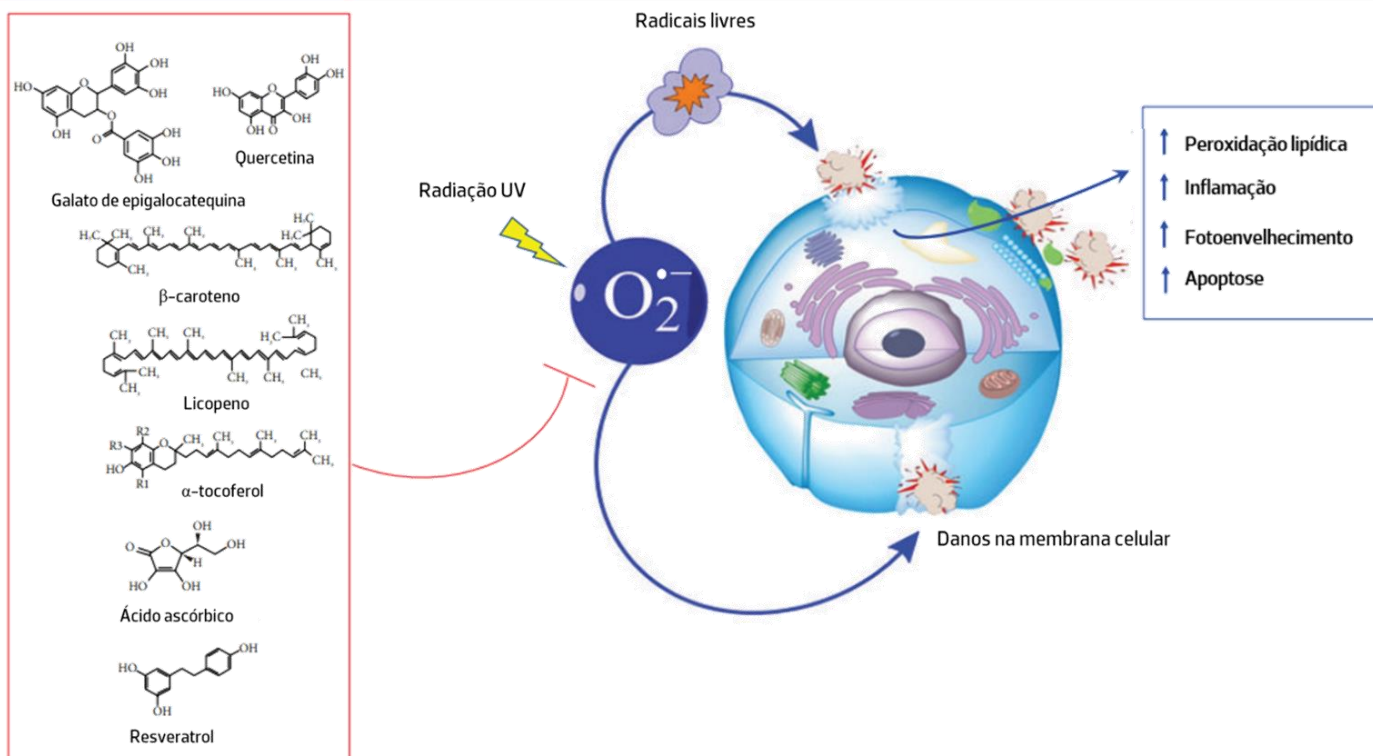


Figura 10 – Vantagens dos compostos antioxidantes de origem natural nos danos causados pelos radicais livres desencadeados pelas radiações UV. Adaptado de Petruk et al. (2018).

O FPS tem vindo a apresentar correlações significativas com o teor de compostos fenólicos e flavonoides, não apresentando a mesma linearidade com a atividade antioxidante (Hashemi et al., 2019; Stevanato et al., 2014).

O estudo de Stevanato et al. (2014) teve por objetivo o estudo de estilbenos (piceídeo, resveratrol), flavonoides (catequina, quercetina, kaempferol, galangina, apigenina, naringenina, crisina, pinocembrina), ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, éster feniletílico do ácido cafeico e ácido dimetilcafeico) quanto potencial fotoprotetora (FPS, relação UVA/UVB e comprimento de onda crítico), com o intuito de perceber a sua associação com a atividade antioxidante dos mesmos. Quanto aos valores de FPS constatou-se que o kaempferol, apigenina e o ácido cafeico apresentaram os valores mais elevados de FPS, FPS = 24,9, FPS = 28,8 e FPS = 28,0, respetivamente (Stevanato et al., 2014). Da relação UVA/UVB, a quercetina foi o único composto com relação superior a 0,8 (proteção máxima contra UVA) (Stevanato et al., 2014). No que concerne ao comprimento de onda crítico este deve ser superior a 370 nm indicando um amplo espectro de proteção, pelo

que todos os flavonoides, o éster fenilético do ácido cafeico e o ácido dimetilcafeico atendem à especificação (Stevanato et al., 2014).

A cerveja artesanal, ao apresentar estes compostos na sua composição, pode constituir uma fonte de compostos bioativos com atividade interessante em termos de fotoproteção. À semelhança do demonstrado para a rutina (flavonoide) no estudo de Tomazelli et al. (2018), onde 0,1% (m/m) do composto foi incorporado numa formulação com uma avobenzona e um ácido 4-aminobenzóico, a fim de se perceber a segurança da formulação, o potencial fotoprotetor (FPS determinado *in vitro* e *in vivo*), hidratação superficial cutânea e potencial antioxidante. A presença da rutina na formulação induziu um aumento de 40% da capacidade de neutralização do radical DPPH (Tomazelli et al., 2018). Nos ensaios *in vitro*, a incorporação de rutina promoveu a diminuição do FPS da formulação, em comparação com o controlo (sem rutina) ( $p < 0,05$ ) (Tomazelli et al., 2018). Por outro lado, na determinação do FPS *in vivo* a formulação com rutina apresentou um FPS estatisticamente superior à formulação sem o composto ( $p < 0,05$ ) (Tomazelli et al., 2018). Para além disso, a formulação com rutina demonstrou-se segura, nem induziu alterações significativas da hidratação da pele ( $p < 0,05$ ) (Tomazelli et al., 2018). Desta forma, a incorporação de extratos de cervejas artesanais em formulações combinadas com filtros sintéticos pode se revelar promissora, podendo potenciar a atividade antioxidante e fotoprotetora da mesma.

O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes (endógenas e exógenas) e a produção exacerbada de ROS culmina no stress oxidativo, desencadeando danos ao nível do DNA, mitocôndrias, lípidos e proteínas, podendo refletir-se em danos cutâneos como dermatites, acne, rosácea, psoríase, fotoenvelhecimento e cancro (Figura 11) (Baek & Lee, 2016).

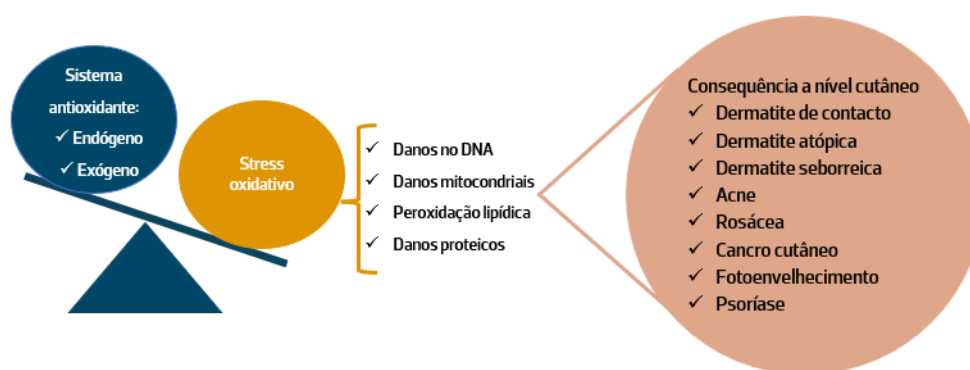


Figura 11 – Consequências do desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e o stress oxidativo. Adaptado de Baek & Lee (2016).

#### 1.4. Potencias benefícios de extratos de cerveja, matérias-primas e subprodutos do seu fabrico a nível cutâneo

Apesar da escassez de estudos que investiguem os potenciais benefícios de extratos de cerveja artesanal na pele, estes podem estar inerentes ao seu potencial antioxidante, documentado em inúmeros estudos (Breda et al., 2022; Censi et al., 2021; S. Silva et al., 2022).

Por outro lado, as matérias-primas e subprodutos do seu fabrico têm vindo a ser associados a atividades promissoras na prevenção de danos cutâneo, que ao poderem condicionar a interação social são mote para procura de produtos cosméticos e/ou procedimentos estéticos que revertam a situação (Dabrowska et al., 2016; Khavkin & Ellis, 2011).

Das atividades enumeradas na tabela 2 destaca-se a aplicabilidade dos extratos na prevenção do envelhecimento cutâneo (atividade anti-elastase, anti-tirosinase, antioxidante e fotoprotetora), em afeções como a acne (atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante), psoríase (atividade anti-inflamatória, antioxidante), hiperhidrose (atividade antibacteriana) e cancro cutâneo (atividade antiproliferativa e anticancerígena).

Tabela 2 - Compilação dos potenciais benefícios de extratos de cerveja, matérias-primas e subprodutos do fabrico cervejeiro na pele.

Tipo de estudo	Matriz	Tipo de extração/ solvente	Atividade potencial	Compostos prováveis	Referência
<i>In silico</i> <i>In vitro</i>	Subprodutos de lúpulo	Propanodiol	Anti-elastase Antioxidante	Cis-iso- $\alpha$ - cohumulona	(Paredes-Ramos et al., 2022)
<i>In vitro</i>	Malte (Caramalte, Aromático, Torrado e Germinado); Subprodutos de malte de cerveja escura e de cerveja de trigo	Água	Anti-tirosinase Antioxidante	Melanoidinas	(Almendinger et al., 2020)
<i>In vitro</i>	Subprodutos de malte	Água	Anti-tirosinase Antioxidante	Ácido ferúlico e ácido <i>p</i> - cumárico	(Shon et al., 2023)
<i>In silico</i> <i>In vitro</i>	Lúpulo	Acetona (70%)	Anti-tirosinase Antioxidante	Taninos	(J. Liu et al., 2022)
<i>In vitro</i>	Lúpulo	Metanol	Anti-tirosinase	Chalconas e flavanonas	(Kim et al., 2016)
<i>In vitro</i>	Lúpulo	Água + propilenoglicol e óleo de girassol	Fotoprotetora Antioxidante	-	(Kurzawa et al., 2022)

<i>In vitro</i>	Subprodutos de <i>S. cerevisiae</i>	-	Síntese de componentes de matriz celular Antioxidante	Mananos e $\beta$ -glucanos	(Costa et al., 2023)
<i>In vitro</i>	Lúpulo	CO <sub>2</sub> supercrítico	Anti-inflamatória	Ácidos- $\alpha$ , ácidos- $\beta$ e óleos essenciais	(Hurth et al., 2022)
<i>In vivo</i>	Lúpulo	Aquoso	Anti-inflamatória	Agliconas e kaempferol	(Segawa et al., 2008)
<i>In vitro</i>	Lúpulo	Etanol	Anti-inflamatória	--	(Gendrisch et al., 2021)
<i>In vitro</i>	Lúpulo	CO <sub>2</sub> supercrítico	Anti-bacteriana Antioxidante Anti-inflamatória	Humulona Lupulona	(Weber et al., 2019)
<i>In vitro</i> <i>In silico</i>	Lúpulo	Etanol	Anti-bacteriana	Rutina	(Di Lodovico et al., 2020)
<i>In vivo</i>	Cerveja industrial suplementada com xanthohumol	-	Cicatrizante Anti-inflamatória Antioxidante	Xanthohumol	(Negrão et al., 2012)
<i>In vitro</i> <i>Ex vivo</i>	Lipossomas unilamelares ultradeformáveis de ácido ferúlico extraído de subprodutos de malte	Ácido sulfúrico e hidróxido de sódio (NaOH)	Cicatrizante	Ácido ferúlico	(Bucci et al., 2020)
<i>In vivo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	NaOH	Anti-proliferativa	Glucanos	(Eom et al., 2021)
<i>In vivo</i>	Lúpulo	hexano e metanol	Anti-cancerígena	Lupulona e a 6-prenilnaringina	(Akazawa et al., 2012)
<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Lúpulo	CO <sub>2</sub> supercrítico	Antibacteriana	-	(Dumas et al., 2009)
<i>In vitro</i>	Subprodutos de malte, lúpulo e levedura de cerveja	Água	Antioxidante	-	(Censi et al., 2021)

No estudo de Paredes-Ramos et al. (2022), os extratos de subprodutos de lúpulo demonstraram potencial atividade anti-elastase, podendo esta estar correlacionada à composição em cis-iso- $\alpha$ -cohumulona, detetada por cromatografia líquida de elevada eficiência – espectrometria de massa – análise de espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). O composto identificado apresentou por técnicas de modelação molecular ligações mais estáveis à elastase, comparativamente a compostos padrão como a quercetina e galhato epigalocatequina (Paredes-Ramos et al., 2022). Foram preparados cinco extratos variando a temperatura de extração (74°C ou 75°C), concentração de propanodiol (79,92%, 98,64% ou

98,75%) e tempo de extração (51,45min, 60,60min, 77,87min, 77,91min), verificando-se, para todos, total inibição da elastase (100%) (Paredes-Ramos et al., 2022). O teor de compostos fenólicos dos extratos variou entre 3940 mg de GAE/L e 4700 mg de GAE/L de amostra e a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC – fluoresceína) variou entre 75,58 mmol de trolox/L e 81,90 mmol de trolox/L de extrato (Paredes-Ramos et al., 2022).

Extratos aquosos de caramalte, malte aromático, malte torrado, malte germinado e subprodutos de malte de cerveja escura e de cerveja de trigo apresentaram potencial atividade anti-tirosinase, sendo esta dependente da concentração (Almendinger et al., 2020). O extrato de malte caramelo, malte torrado e malte germinado, na concentração de 1%, apresentaram maior percentagem de inibição da tirosinase (87%, 86% e 80%, respetivamente), potencialmente associada à presença de melanoidinas (Almendinger et al., 2020). Os extratos de malte caramelo e torrado apresentaram maior teor de compostos fenólicos (12,9 mg de GAE/g) e de neutralização do radical  $ABTS^{\cdot+}$  (1,68  $\mu$ mol de equivalente de trolox/g) em comparação com o malte aromático, malte germinado e com os subprodutos (Almendinger et al., 2020). Os extratos de malte aromático, caramalte e malte torrado inibiram a formação de 2',7'- dihidrofluoresceína (DCF) em 72%, 68% e 63%, respetivamente (Almendinger et al., 2020).

No estudo de Shon et al. (2023), o extrato aquoso de subprodutos de malte, também, exibiu potencial inibição da tirosinase, uma vez que inibiu a L-DOPA em células de melanoma de murino (B16F10), de forma dependente da dose. Para além disso, o extrato reduziu a expressão de proteínas relacionadas com a tirosinase - 1 (TRP-1) e proteínas relacionadas com a tirosinase - 2 (TRP-2), envolvidas na síntese de melanina (Shon et al., 2023). O aumento de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) e quinases N-terminais c-jun (JNK) combinado com a diminuição de  $p$ -38 sugere que o extrato de subprodutos de malte regule negativamente o fator de transcrição indutor de melanócitos (MITF) através da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogénio (MPAK) (Shon et al., 2023). Adicionalmente, pelo estudo do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de TRP-1 e TRP-2 e tirosinase, o extrato de subprodutos de malte pareceu regular os genes associados à síntese de melanina (Shon et al., 2023). O estudo do extrato em modelo 3D de pele humana, durante sete dias, denotou a inibição da pigmentação, de modo dependente da dose (Shon et al., 2023). Shon et al. (2023) apontaram que a potencial atividade anti-tirosinase pode estar correlacionada com a composição dos subprodutos de malte em ácido ferúlico e ácido  $p$ -

cumárico. A atividade antioxidante do extrato foi determinada pelo ensaio da neutralização do radical DPPH,  $ABTS^{\cdot+}$ ,  $H_2O_2$  e pelo ensaio da capacidade antioxidante total, denotando-se um aumento desta atividade com o aumento da concentração do extrato (Shon et al., 2023). A composição em polifenóis ( $0,11 \pm 0,00$  mM equivalentes de catequina) e flavonoides ( $1,55 \pm 0,05$   $\mu$ g de equivalentes de quercetina/mg de extrato) são descritos como podendo ser responsáveis pela atividade antioxidante do extrato (Shon et al., 2023).

No estudo de J. Liu et al. (2022) procedeu-se ao estudo do potencial anti-tirosinase e antioxidante de extrato de taninos isolados de lúpulo, a fim de se perceber o seu potencial como agente anti-despigmentante. Os taninos isolados de lúpulo apresentaram maior capacidade de inibição da tirosinase ( $IC_{50} = 76,52 \pm 6,56$   $\mu$ M), comparativamente ao ácido kójico ( $IC_{50} = 49,524 \pm 2,08$   $\mu$ M), composto com atividade anti-tirosinase conhecida (J. Liu et al., 2022). O extrato de taninos foi alvo de análise por ressonância magnética nuclear e HPLC-ESI-MS/MS, determinando-se a sua composição em taninos condensados com subunidades de epicatequina e epigalocatequina (J. Liu et al., 2022). A composição em epicatequinas do extrato acetónico de lúpulo pode ser responsável pela inibição competitiva da tirosinase, dado que a epicatequina apresenta semelhanças estruturais à L-DOPA (terminações em catecóis) (J. Liu et al., 2022). Além disso, a capacidade dos taninos se ligarem a proteínas por ligações de hidrogénio, pode induzir a inibição não competitiva da enzima (J. Liu et al., 2022). A quelatação de iões cobre pelo extrato pode constituir outro mecanismo de atuação, tendo em conta que estes iões são cofatores da tirosinase, essenciais à ação catalisadora (J. Liu et al., 2022). A atividade antioxidante do extrato de taninos do lúpulo foi estimada pelo ensaio da neutralização dos radicais  $ABTS^{\cdot+}$  ( $IC_{50} = 1,52 \pm 0,02$   $\mu$ M) e DPPH ( $IC_{50} = 1,17 \pm 0,08$   $\mu$ M), apresentando capacidade antioxidante superior ao controlo, ácido ascórbico ( $p < 0,05$ ) (J. Liu et al., 2022). Tal potencialidade, pode estar correlacionada com a composição em polifenóis (J. Liu et al., 2022).

Num outro estudo Kim et al. (2016) foram preparados quatro extratos distintos de lúpulo com os solventes acetato de etilo, metanol, metanol 50% e água destilada, com o intuito de se avaliar qual o mais eficaz na inibição da tirosinase. O extrato metanólico de lúpulo apresentou capacidade inibitória da tirosinase superior ( $IC_{50} = 61,2 \pm 2,4$   $\mu$ g/mL) aos extratos de acetato de etilo ( $IC_{50} = 131,2 \pm 3,7$   $\mu$ g/mL), metanol a 50% ( $IC_{50} = 87,4 \pm 1,4$   $\mu$ g/mL) e água destilada (não detetado) (Kim et al., 2016). O extrato foi submetido a cromatografia líquida de média pressão, exibindo na sua composição chalconas (xanthohumol, 4'-O-metilxanthohumol,

xanthohumol C, flavocaína C, xanthohumol B) e flavanonas (6-prenilnarigenina e isoxanthohumol) (Kim et al., 2016). Todos os compostos isolados demonstraram potencial inibitório da tirosinase (valor de  $IC_{50}$  variou entre 15,4  $\mu$ M e 77,4  $\mu$ M) e da L-DOPA (valor de  $IC_{50}$  variou entre 31,1  $\mu$ M e 157,4  $\mu$ M) (Kim et al., 2016). As chalconas pareceram inibir competitivamente a L-tirosinase e a L-DOPA, enquanto que as flavanonas aparentaram inibir a L-tirosinase de forma mista (Kim et al., 2016). A presença e número de grupos isoprenil e hidroxil dos compostos pareceram melhorar o potencial de inibição da tirosinase (Kim et al., 2016).

No estudo de Kurzawa et al. (2022) foram preparados três tipos de extratos de cones de lúpulo: água, óleo de girassol e água + propilenoglicol nas concentrações, alvo de estudo quanto ao potencial fotoprotetor contra as radiações UVA e UVB. O extrato aquoso-glicólico (água + propilenoglicol) de lúpulo demonstrou maior proteção contra os efeitos negativos das radiações UVA em relação ao extrato aquoso e oleoso (óleo de girassol) de lúpulo (Kurzawa et al., 2022). Por outro lado, o extrato oleoso de lúpulo demonstrou maior efeito protetor contra as radiações UVB (FPS variou entre 4,30 e 21,05), seguindo-se o extrato aquoso-glicólico (FPS variou entre 3,19 e 10,18) e o extrato aquoso (FPS variou entre 1,27 e 5,58) (Kurzawa et al., 2022). O extrato aquoso-glicólico apresentou maior teor em compostos fenólicos (4017,41  $\pm$  131,56 mg de ácido cafeico/ 100g de extrato) e maior capacidade em reduzir os íons  $Cu^{2+}$  (1395,97  $\pm$  22,33 mg de ácido cafeico/100g de extrato), comparativamente ao extrato aquoso (Kurzawa et al., 2022).

Por sua vez, no estudo de Costa et al. (2023) estudou-se o efeito citotóxico de mananos e  $\beta$ -glucanos extraídos de subprodutos de *S. cerevisiae* em queratinócitos humanos (células HaCaT) e fibroblastos dérmicos humanos primários (células HDFa), bem como a capacidade dos extratos em induzir a síntese de compostos da matriz celular. Os extratos não apresentaram citotoxicidade até à concentração máxima testada, 500  $\mu$ g/mL. Quanto ao potencial antioxidante, segundo o ensaio ORAC, os extratos com menor peso molecular apresentaram melhor capacidade antioxidante, comparativamente aos extratos com maior peso molecular ( $p < 0,05$ ), não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre mananos e  $\beta$ -glucanos (Costa et al., 2023). O extrato de  $\beta$ -glucanos induziu a síntese significativa de pró-colágeno I intracelular em células HDFa, em comparação com o controlo (níveis basais) e com o extrato de mananos ( $p < 0,05$ ) (Costa et al., 2023). Por outro lado, no que concerne à síntese de pró-colágeno I extracelular esta foi significativamente superior nos

extratos com maior peso molecular ( $p < 0,05$ ) (Costa et al., 2023). Nas células HDFa verificou-se um aumento significativo da síntese de ácido hialurônico nos extratos com maior peso molecular, em comparação com o controlo e com os extratos de menor peso molecular ( $p < 0,05$ ) (Costa et al., 2023). Por outro lado, nas células HaCaT a síntese de ácido hialurônico foi significativamente inferior aos níveis basais ( $p < 0,05$ ) (Costa et al., 2023). A produção de citoqueratina – 14 pelas células HaCaT foi estatisticamente superior na presença do extrato de mananos ( $p < 0,05$ ), enquanto que a produção de aquaporinas –9 foi estatisticamente superior na presença do extrato de  $\beta$ -glucanos ( $p < 0,05$ ), comparativamente aos restantes extratos e níveis basais (Costa et al., 2023). A produção de elastina por células HDFa aumentou, significativamente, na presença do extrato de mananos ( $p < 0,05$ ), em comparação com os restantes extratos e níveis basais (Costa et al., 2023). A produção de fibronectina foi superior na presença do extrato  $\beta$ -glucanos ( $p < 0,05$ ), comparativamente aos demais e níveis basais (Costa et al., 2023).

O estudo de Hurth et al. (2022) teve por objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato lúpulo obtido por  $\text{CO}_2$  supercrítico, bem como proceder à sua incorporação em duas formulações cutâneas óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), a fim de perceber qual a mais promissora na prevenção de formação de eritema por exposição à radiação UVB de voluntários saudáveis. Os queratinócitos humanos primários (PHKs) foram incubados com o extrato de lúpulo na concentração 4  $\mu\text{g/mL}$ , sendo, posteriormente, a inflamação desencadeada por um simulador de radiação solar (UVA, UVB e luz visível), verificando-se que o extrato diminuiu significativamente a fosforilação de  $p$ -38 ( $p < 0,001$ ) e  $p$ -ERK ( $p < 0,01$ ) (Hurth et al., 2022). O extrato foi mais eficiente na diminuição de  $p$ -38 ( $p < 0,05$ ), comparativamente à hidrocortisona (20  $\mu\text{g/mL}$ ) (controlo positivo), no caso de  $p$ -ERK, a atividade de ambos foi comprável (Hurth et al., 2022). No que concerne à secreção de IL-6 e IL-8, estas diminuíram significativamente na presença do extrato de lúpulo ( $p < 0,01$ ), com atividade comparável à hidrocortisona na inibição de IL-6, porém a diminuição de IL-8 foi mais eficiente na presença de hidrocortisona ( $p < 0,001$ ) (Hurth et al., 2022). As formulações apresentaram estabilidade após três meses e boa tolerância cutânea (Hurth et al., 2022). A formulação O/A demonstrou diminuir significativamente a formação de eritema, comparativamente ao controlo (pele com aplicação do veículo O/A exposta à radiação) ( $p < 0,01$ ) (Hurth et al., 2022). Apesar da diminuição de formação de eritema pela formulação O/A com 1% de hidrocortisona ter sido superior ( $p < 0,001$ ), os efeitos foram considerados

comparáveis (Hurth et al., 2022). Por outro lado, a formulação A/O não apresentou diferenças estatísticas com o controlo (veículo A/O exposto à radiação), quer na formulação com extrato de lúpulo quer na presença de hidrocortisona (Hurth et al., 2022). Tal, pode advir da menor capacidade de libertação dos ativos incorporados na formulação A/O, observada para ambas as formulações de hidrocortisona pelo método de célula de difusão de Franz, onde se verificou que a libertação do ativo foi estatisticamente mais rápida na formulação O/A ( $p < 0,05$ ) (Hurth et al., 2022). O extrato foi alvo de análise por HPLC, apresentando na sua constituição  $\alpha$ -ácidos (humulonas: cohumulona e adhumulona),  $\beta$ -ácidos (lupulonas: colupulona e adlupulona) e óleos essenciais (Hurth et al., 2022).

Segawa et al. (2008) estudaram o efeito da administração oral de um extrato aquoso de lúpulo (100 mg/Kg ou 500 mg/Kg) em ratos NC/Nga (modelo de dermatite atópica) inoculados com antigénio de ácaros, *Dermatophagoides farinae*, na orelha uma vez por semana durante dez semanas. O extrato de lúpulo inibiu significativamente a produção de imunoglobulinas E (IgE), os níveis de IL-12 e o edema das orelhas ( $p < 0,05$ ) (Segawa et al., 2008).

Gendrisch et al. (2021) estudaram a possibilidade do extrato etanólico de alta pressão de lúpulo obtido por extração supercrítica de CO<sub>2</sub> ser utilizado na psoríase, caracterizada pela hiperproliferação de queratinócitos e secreção de citocinas pró-inflamatórias. O extrato não apresentou a atividade citotóxica para queratinócitos humanos primários (células HPK) até à concentração de  $0,22 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ , garantindo viabilidade celular superior a 80% (Gendrisch et al., 2021). A psoríase foi induzida pela inoculação das células HPK com as citocinas inflamatórias. O extrato na concentração  $1 \mu\text{g/mL}$  diminuiu a expressão génica de defensina- $\beta$ -4 ( $p < 0,01$ ), KRT17 (marcador de hiperproliferação) ( $p < 0,01$ ), GLUT1 (transportador de glicose) ( $p < 0,01$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ), IL-8 ( $p < 0,01$ ), p65 (subunidade do fator de transcrição nuclear kappa B) ( $p < 0,001$ ) e pSTAT3 (marcador inflamatório) ( $p < 0,05$ ), genes característicos de quadros de psoríase (Gendrisch et al., 2021). Em tecidos *ex-vivo*, o extrato induziu a diminuição da expressão de IL-6 ( $p < 0,05$ ) e IL-8 ( $p < 0,05$ ), ao contrário do controlo positivo, dítanol (fármaco utilizado na terapia psoriática). Para além disso, segundo as colorações imuno-histoquímicas, o extrato induziu a diminuição da expressão psoriasina, defensina- $\beta$ -2 e GLUT1 (Gendrisch et al., 2021).

O estudo de Weber et al. (2019) avaliou o potencial antioxidante, anti-inflamatório, e antibacteriano (em *Cutibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*) de um extrato de CO<sub>2</sub>

supercrítico de lúpulo com teor padronizado em humulonas e lupulonas, por HPLC. Segundo a técnica de microdiluição, a concentração mínima inibitória (MIC) do extrato contra *C. acnes* 199, 209 e ATCC 6919 foi de 3,1 µg/mL, para a *C. acnes* 201 o MIC variou entre 3,1 µg/mL e 6,2 µg/mL, MIC superiores aos encontrados para a clindamicina (igual a 0,8 µg/mL para *C. acnes* 199 e inferior a 0,2 µg/mL para as restantes) (Weber et al., 2019). No caso de *S. aureus* ATCC 29213 e 25923 o MIC do extrato variou entre 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL, para *S. aureus* 2407 foi 6,25 µg/mL e para *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) 4810 foi 12,5 µg/mL (Weber et al., 2019). A clindamicina apresentou menor MIC para todas as espécies de *S. aureus*, à exceção de *S. aureus* MRSA 4810 cujo MIC foi superior a 50 µg/mL, pelo que o extrato se demonstrou mais eficiente (Weber et al., 2019). O potencial antioxidante e anti-inflamatório foi determinado em células HPKs (Weber et al., 2019). O stress oxidativo foi induzido nas células HPKs pela sua inoculação com o reagente 5 (6) – carboxifluoresceína (CDFDA) com exposição simultânea a radiação (8 J/cm<sup>2</sup>) com formação de DCF (emissão de fluorescência), verificando-se que o extrato de lúpulo reduziu a formação de DCF a partir da concentração de 2 µg/mL, de forma dependente da dose (valor de IC<sub>50</sub> do extrato foi igual a 29,43 µg/mL) (Weber et al., 2019). A luteolina foi utilizada como controlo positivo, tendo o extrato de lúpulo um efeito comparável a esta na concentração 32 µg/mL. O extrato não se revelou tóxico nem fototóxico (Weber et al., 2019). A atividade anti-inflamatória foi determinada pela concentração de IL-6 libertadas pelas células HPKs após a sua exposição a radiação com 8 J/cm<sup>2</sup>, por simulador solar (Weber et al., 2019). A expressão de IL-6 diminuiu estatisticamente ( $p < 0,01$ ) nas células expostas à radiação, na presença de concentrações superiores a 1 µg/mL de extrato de lúpulo, inclusive (IC<sub>50</sub> = 0,8 µg/mL) (Weber et al., 2019). A incorporação do extrato de lúpulo na concentração de 0,3% num gel (com extrato de raiz casca de *Salix daphnoides*, extrato de raiz de *Gentiana lutea*, óleo de folha / ramo de *Leptospermum scoparium* e óleo de *Mentha arvenses*) de aplicação tópica revelou, segundo o ensaio de difusão em disco, uma inibição significativa de *C. acnes* em comparação com o gel placebo ( $p < 0,05$ ) (Weber et al., 2019). No caso de *S. aureus* não foram encontradas diferenças significativas entre os halos de inibição do gel com lúpulo do gel placebo. Em ambas as situações, foi utilizado um gel comercial de clindamicina e peróxido de benzoílo como controlo positivo, o qual apresentou halos de inibição estatisticamente superiores aos demais ( $p < 0,05$ ) (Weber et al., 2019). Por outro lado, um gel comercial para acne com retinol e *Boswellia serrata* não inibiu nenhuma das duas bactérias em estudo (Weber et al., 2019).

O extrato hidroalcoólico de lúpulo foi testado quanto ao seu potencial antibacteriano contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *C. acnes* (Di Lodovico et al., 2020). Para as espécies de *S. aureus* Sa1 (MIC = 16 µg/mL), Sa3 (MIC = 16 µg/mL), SA007 (MIC = 16 µg/mL) e SA010 (MIC = 8 µg/mL) o extrato apresentou menor MIC, comparativamente ao controle positivo, ciprofloxacina (MIC *S. aureus* Sa1 e Sa3 = 128 µg/mL, MIC *S. aureus* SA007 e SA010 = 64 µg/mL) (Di Lodovico et al., 2020). No caso de *C. acnes*, o extrato apresentou MIC igual à ciprofloxacina (Di Lodovico et al., 2020). Da análise por HPLC, foi detetada a presença de ácido gálico, resveratrol e rutina no extrato do lúpulo, sendo a rutina a que se encontrava em maior concentração (Di Lodovico et al., 2020). A análise de *docking* molecular da rutina evidenciou a sua capacidade de ligação às proteínas ligadoras de penicilina 2a (PBP2a) e 3- cetoacil-ACP sintase (KAS III), o que se traduz na sua capacidade em colmatar a resistência aos antibióticos (Di Lodovico et al., 2020). O potencial antibacteriano pode estar associado ao aumento da rigidez da membrana bacteriana induzida pelo extrato (Di Lodovico et al., 2020). Para além disso, o extrato reduziu a formação de biofilmes bacterianos para as bactérias em estudo, o que é indicativo da sua interferência na aderência bacteriana (Di Lodovico et al., 2020).

Negrão et al. (2012) analisaram o impacto da ingestão oral da cerveja Stout e da mesma cerveja alvo de suplementação com xanthohumol (10 mg/L), em comparação aos grupos controle (água e etanol a 5%), na capacidade de promoção da cicatrização cutânea. As feridas foram induzidas nos ratos quatro semanas após o início do estudo através de incisões com suturas cirúrgicas (Negrão et al., 2012). Após uma semana, o estudo revelou ausência de toxicidade hepática e de alterações significativas no metabolismo dos carboidratos e lipídicos (Negrão et al., 2012). A ingestão de cerveja industrial suplementada com xanthohumol por ratos sujeitos a incisões reduziu significativamente o número de vasos sanguíneos na área da ferida, os valores de VEGF, de N-acetil-D-glucosaminidase (NAG), óxido nítrico (NO) e os níveis IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) (Negrão et al., 2012). A cerveja suplementada aumentou significativamente as defesas antioxidantes pelo aumento da razão glutatona reduzida/ glutatona oxidada (GSH/GSSH) em comparação aos grupos controle ( $p < 0,05$ ) (Negrão et al., 2012). Assim, a presença de xanthohumol melhorou o processo de cicatrização de feridas, reduzindo a inflamação, o stress oxidativo e a angiogénese (Negrão et al., 2012).

O objetivo do trabalho de Bucci et al. (2020) foi extrair o ácido ferúlico de subprodutos de malte, a sua encapsulação num nanossistema, avaliar a sua segurança em células HaCaT, a capacidade de reepitelização e de penetrabilidade cutânea. O ácido ferúlico foi encapsulado

em lipossomas unilamelares ultradeformáveis (tamanho igual a  $140 \pm 11,4$  nm, índice de polidispersividade igual a 1,7 e potencial zeta de  $-21,6$  mV), com eficiência de encapsulamento de aproximadamente de 92%, garantindo estabilidade durante um mês (Bucci et al., 2020). O ácido ferúlico e os lipossomas unilamelares ultradeformáveis de ácido ferúlico não se demonstraram tóxicos nas concentrações compreendidas entre  $2,73$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  a  $21,85$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , apesar da viabilidade ter diminuído face ao grupo controlo (Bucci et al., 2020). A capacidade de reepitelização dos lipossomas unilamelares ultradeformáveis de ácido ferúlico na concentração  $21,85$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi testada após se induzir danos nas células HaCaT com uma ponta de plástico, denotando-se a ação reparadora do extrato comparativamente ao controlo (Bucci et al., 2020). A capacidade de penetrabilidade das nanopartícula foi determinada *ex-vivo*, verificando-se a presença de ácido ferúlico na camada basal da epiderme, atingindo inclusive a derme, pelo que o nanossistema cumpriu o pressupostos de veicular o ácido ferúlico até às camadas mais profundas da pele (Bucci et al., 2020).

No estudo de Eom et al. (2021) foi objetivo o estudo de glucanos presentes em *S. cerevisiae* quanto à sua capacidade de inibir células de melanoma (Eom et al., 2021). O potencial anti-proliferativo do extrato de glucanos foi determinado em células de melanoma de ratos (células B16F10) incubadas com os quatro extratos de glucanos (Eom et al., 2021). O extrato obtido nas condições de 0,2 M de NaOH,  $50^{\circ}\text{C}$  com tempo de incubação de 3H, nas concentrações  $200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  e  $400$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , reduziu significativamente a proliferação celular e a secreção de biomarcadores tumorais (ciclina D1 e c-myc) por B16F10 ( $p < 0,05$ ) (Eom et al., 2021). Dos ensaios *in vivo* em ratos com xenoenxertos de B16F10 ( $5 \times 10^5$  células), o aumento do volume do tumor foi atenuado com o extrato em estudo após dois dias de tratamento, sendo a diferença significativa no sexto dia de tratamento ( $p < 0,05$ ), comparativamente ao grupo controlo. Para além disso, verificou-se a diminuição significativa de ciclina D1 ( $p < 0,05$ ) (Eom et al., 2021). A ausência de perda de peso corporal dos ratos sugere a ausência de toxicidade do extrato (Eom et al., 2021).

Akazawa et al. (2012) identificaram no lúpulo (hexano: metanol) por HPLC e espectrometria de massa a presença de cinco derivados de floroglucínóis (5-deprenilupuonol, lupulona C, colupox, lupulona E, ácido hulupínico), cinco chalconas (xanthohumol, xanthohumol C, 1,2-dihidroxantohumol C, xanthohumol I e 4,5-dihidro-3-hidroxi-2,2dimetil-2H-piranol-4,4-dihidroxi-6-metoxichalcona), quatro flavanonas (8-prenilnaringina, isoxanthohumol, munduleaflavanona, 6-prenilnaringina), dois glicosídeos de flavonol (astragalina, quercetina),

cinco triterpenóides (lupeol,  $\alpha$ -amirina, urso-9, 12-dien-3 $\beta$ -ol,  $\beta$ -amirina e  $\delta$ -amirina), sendo objetivo do seu estudo analisar o potencial anti-inflamatório e anti-tumoral de cada um dos compostos identificados. Para o estudo da atividade anti-inflamatória dos compostos 5-deprenilupuonol, lupulona C, colupox, lupulona E, xanthohumol, 8-prenilnaringina, isoxanthohumol, 6-prenilnaringina, astragalina, quercetina, lupeol e  $\alpha$ -amirina a inflamação foi induzida em ratos com 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Akazawa et al., 2012). A indometacina (fármaco anti-inflamatório utilizado como controlo positivo) necessitou de 0,91  $\mu$ mol/orelha para inibição de 50% do processo inflamatório, enquanto os restantes compostos, à exceção dos glicosídeos de flavonol ( $IC_{50} > 2,16 \mu$ mol/orelha) e 5-deprenilupuonol (1,06  $\mu$ mol/orelha), necessitaram de uma menor concentração para induzir o mesmo nível de inibição (0,13 – 0,83  $\mu$ mol/orelha) (Akazawa et al., 2012). O lupeol apresentou maior capacidade inibitória da inflamação (0,13  $\mu$ mol/orelha) (Akazawa et al., 2012). Desta forma, os compostos demonstraram-se, genericamente, mais eficientes que a indometacina na inibição da inflamação (Akazawa et al., 2012). Além disso, os resultados sugerem que a prenilação da estrutura química dos compostos torna-os mais potentes (Akazawa et al., 2012). A inflamação pelo vírus de Epstein-Barr foi induzida em células rajie (células de linfoblastoide B) por TPA e todos os compostos identificados foram submetidos a estudo quanto ao seu potencial anti-inflamatório (Akazawa et al., 2012). A elevada percentagem de viabilidade das células rajie (60–70%), aquando de inoculadas com os compostos na maior concentração (1000 mol/ 32 pmol TPA), revelou a baixa toxicidade dos mesmos (Akazawa et al., 2012). O  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A, foi utilizado como controlo positivo pelas suas características quimiopreventivas ( $IC_{50} = 397$  mol/32 pmol TPA). Dos compostos em estudo 5-deprenilupuonol, lupulona C, colupox, lupulona, 8-prenilnaringina, isoxantohumol, munduleaflavanona, 6-prenilnaringina, lupeol, e  $\delta$ -amirina mostraram-se equivalentes ao controlo positivo tendo em conta a faixa de inibição (215–393 mol/32pmol de TPA) (Akazawa et al., 2012). Os compostos lupulona e 6-prenilnaringina foram estudados quanto ao potencial anticancerígeno (Akazawa et al., 2012). Deste modo, a carcinogénese foi induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e promovida por TPA em pele de ratos (Akazawa et al., 2012). Os ratos do grupo controlo apresentaram maior incidência de papiloma comparativamente aos grupos tratados (Akazawa et al., 2012). Após onze semanas de tratamento a incidência de papiloma foi igual a 27% no grupo tratamento com lupulona e 20% no grupo tratado com 6-prenilnaringina, na semana vinte a incidência para ambos os grupos foi igual a 87%, sendo de

100% para o grupo não tratado (Akazawa et al., 2012). Ao fim das vinte semanas de tratamento o número de papilomas por rato foi igual a  $8,6 \pm 1,6$  no grupo não tratado,  $3,8 \pm 1,4$  no grupo tratado com lupulona e  $3,2 \pm 1,3$  no grupo tratado com 6-prenilnaringina (Akazawa et al., 2012).

O extrato de CO<sub>2</sub> supercrítico de lúpulo quando inoculado com esfregaços axilares inibiu totalmente as colónias bacterianas na concentração de 31,25 µg/mL (Dumas et al., 2009). O extrato de lúpulo apresentou melhores características antimicrobianas contra *Corynebacterium xerosis* (MIC = 6,25 µg/mL) e *S. epidermidis* (MIC = 25 µg/mL) comparativamente aos compostos isolados cohumulona e humulona (MIC contra *C. xerosis* > 100 µg/mL e contra *S. epidermis* = 50 µg/mL), pelo que foi incorporado numa formulação desodorizante base na concentração de 0,2%, a qual apresentou maiores halos de inibição contra *C. xerosis* (19 mm) e *S. epidermis* (11 mm) que a formulação controlo (halo de inibição igual a 11 mm contra *C. xerosis* e igual a 9 mm contra *S. epidermis*) (Dumas et al., 2009). A aplicação da formulação desenvolvida demonstrou, nos testes sensoriais, a diminuição do odor axilar de  $6,28 \pm 0,70$  para  $1,80 \pm 0,71$  após 8H de aplicação, para  $1,82 \pm 0,74$  após 12H e para  $2,24 \pm 0,77$  após 24H (Dumas et al., 2009).

No estudo de Censi et al. (2021), os extratos aquosos de subprodutos de malte, lúpulo e levedura foram analisados quanto ao potencial citotóxico sobre células HaCaT durante 24H. Concentrações de extrato inferiores a 0,03 mg/mL, não demonstraram citotoxicidade. A atividade mitocondrial foi determinada pela incubação dos extratos na concentração 0,03 mg/mL na ausência de meio nutritivo, denotando-se um aumento significativo da atividade mitocondrial na presença de subprodutos lúpulo ( $p < 0,01$ ) e subprodutos de levedura ( $p < 0,05$ ), não se verificando diferenças significativas na presença de subprodutos de malte, comparativamente ao controlo com ausência de nutrientes (Censi et al., 2021). Este, por sua vez, apresenta uma atividade metabólica estatisticamente inferior ao controlo na presença de meio rico em nutrientes ( $p < 0,0001$ ) (Censi et al., 2021). Os extratos de subprodutos de malte, lúpulo e levedura na concentração 0,03 mg/mL diminuíram significativamente a formação de ROS induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na linhagem celular em estudo, comparativamente às células incubadas exclusivamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) (Censi et al., 2021). No ensaio de pré-incubação, as células foram inicialmente incubadas durante 2H com os extratos na concentração 0,03 mg/mL, sendo posteriormente adicionado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Censi et al., 2021). Apenas os extratos de subprodutos de lúpulo e levedura foram capazes de diminuir a

formação de ROS ( $p < 0,05$ ) (Censi et al., 2021). O TCF foi determinado em todas as fases do processo de fabrico das cervejas artesanais, verificando-se que o extrato etanólico de malte (variou entre  $28,523 \pm 0,697$  mg de GAE/g a  $72,143 \pm 1,866$  mg de GAE/g), os extratos aquosos (variou de  $92,299 \pm 0,919$  mg de GAE/g a  $104,397 \pm 2,911$  mg de GAE/g) e etanólicos ( $140,537 \pm 1,326$  mg de GAE/g a  $143,668 \pm 4,229$  mg de GAE/g) de lúpulo (Perle e Saaz) e o extrato aquoso de subprodutos de levedura ( $31,837 \pm 1,347$  mg de GAE/g a  $44,521 \pm 1,777$  mg de GAE/g) apresentaram as maiores concentrações (Censi et al., 2021). O TCF das cervejas artesanais finais variou entre  $18,961 \pm 1,082$  mg de GAE/g e  $30,927 \pm 0,667$  mg de GAE/g (Censi et al., 2021). As etapas com extratos aquosos e etanólicos permitiram aferir que à exceção dos extratos de subprodutos de levedura ( $31,837 \pm 1,347$  mg de GAE/g a  $44,521 \pm 1,777$  mg de GAE/g para extrato aquoso e  $14,274 \pm 1,507$  mg de GAE/g a  $23,348 \pm 4,209$  mg de GAE/g para extrato etanólico), os extratos etanólicos apresentam maior TCF que os extratos aquosos (por exemplo, nos extratos aquosos de malte o TCF variou entre  $11,672 \pm 1,814$  mg de GAE/g a  $16,568 \pm 2,412$  mg de GAE/g e no extrato etanólico variou entre  $28,523 \pm 0,697$  mg de GAE/g a  $72,143 \pm 1,866$  mg de GAE/g) (Censi et al., 2021). O potencial antioxidante foi estimado para todas as etapas do processo de fabrico pelos ensaios DPPH, ABTS e FRAP (Censi et al., 2021). Nos ensaios antioxidantes a capacidade da cerveja artesanal neutralizar os radicais DPPH (variou entre  $5,544 \pm 0,324$   $\mu\text{mol/g}$  a  $14,785 \pm 2,235$   $\mu\text{mol/g}$ ),  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  ( $28,452 \pm 1,507$   $\mu\text{mol/g}$  a  $43,687 \pm 3,508$   $\mu\text{mol/g}$ ) e o poder antioxidante redutor do ferro ( $104,046 \pm 7,680$   $\mu\text{mol/g}$  a  $125,159 \pm 1,237$   $\mu\text{mol/g}$ ) foi inferior a outras frações como a mistura de lúpulos, que para os ensaios realizados apresentou o maior potencial antioxidante (neutralização do DPPH variou entre  $72,457 \pm 11,425$   $\mu\text{mol/g}$  a  $341,825 \pm 36,986$   $\mu\text{mol/g}$ , a neutralização do  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  variou entre  $314,732 \pm 9,467$   $\mu\text{mol/g}$  a  $3935,707 \pm 108,798$   $\mu\text{mol/g}$  e o os valores de FRAP variaram entre  $53,718 \pm 65,966$   $\mu\text{mol/g}$  a  $151,032 \pm 0,179$   $\mu\text{mol/g}$ ) (Censi et al., 2021).

Em suma, o presente trabalho pretende aliar o potencial antioxidante das cervejas artesanais liofilizadas (isoladas e em associação com extratos de cereja) à fotoproteção e à capacidade regeneradora, colmatando a escassez de evidência científica. Assim, pretende-se dar resposta à questão problema "Será que existem benefícios na inclusão de extratos de cerveja artesanal isolada ou em combinação com extratos aquoso (CA) e etanólico (CE) de cereja Lapins em formulações para aplicação cutânea?".

## 2. Objetivos

O presente trabalho de investigação pretende:

- ✓ Avaliar as atividades antioxidante e fotoprotetora de cervejas artesanais e industriais:
  - Determinar o TCF totais segundo o método de *Folin - Ciocalteu*;
  - Avaliar a atividade antioxidante através dos ensaios: ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FRAP e da atividade quelante de metais (ferrozina);
  - Estimar o potencial fotoprotetor através da determinação do FPS e da capacidade de absorção UV;
  - Avaliar a viabilidade celular de células HaCaT, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), após incubação com os extratos em estudo;
- ✓ Avaliar o benefício da incorporação de extratos aquoso (CA) e etanólico (CE) de *Prunus avium* Lapins na cerveja artesanal mais promissora através da determinação do TCF, da atividade antioxidante (ensaio ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FRAP, ferrozina), do potencial fotoprotetora (FPS e capacidade de absorção UV) e da viabilidade de células HaCaT (ensaio MTT).
- ✓ Avaliar o efeito protetor da cerveja artesanal mais promissora isolada e após incorporação de CA e CE de *Prunus avium* Lapins em células HaCaT, através de um ensaio de pré-incubação.

### 3. Métodos

#### 3.1. Reagentes

Os reagentes *Folin-Ciocalteu*, tartarato de sódio ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) e *t*-BOOH foram adquiridos na Sigma - Aldrich® (St. Louis, EUA). Ácido dinitrosalicílico (DNS) e fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram obtidos na Sigma Life Sciences® (EUA). NaOH e sulfato de ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) foram adquiridos na VWR Life Science® (Ohio, EUA). Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi obtido na VWR Prolabo® (Ohio, EUA). Ácido acético glacial, cloreto de ferro anidro III ( $\text{FeCl}_3$ ), fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e etanol foram adquiridos em VWR Chemical® (Ohio, EUA). A ferrozina foi adquirida em Alfa Aesar® (EUA). Cloreto de sódio (NaCl), dimetil-sulfóxido (DMSO) foram adquiridos em Fisher Chemical® (Reino Unido). Ácido gálico e ácido clorídrico a 37% (HCl) foram obtidos em Merck KGaA® (Darmstadt, Alemanha). Trolox e o ABTS foram adquiridos na TCI® (Tóqui, Japão). Fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) foi obtido em J.T.Baker® (Haryana, Índia). 2,4,6 - Tris (2 - piridil) - s - triazina (TPTZ) e MTT foram obtidos na Acros Organics® (Geel, Bélgica). Acetato de sódio anidro e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram obtidos na Panreac® (Madrid, Espanha). A glicose foi obtida em Labkem® (Barcelona, Espanha). Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) foi obtido em Atom scientific® (Manchester, Reino Unido). Persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{O}_4\text{S}_2$ ) foi obtido em Biochem- chemopharma® (França). Tripsina 0,25% - EDTA 0,02% em HBSS, solução de antibiótico e antimicótico, soro fetal bovino (FBS) e meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) foram obtidos Biowest® (Nuaille, França). Solução tampão de fosfato salino (PBS) foi obtida em Corning® (Manassas, EUA).

### 3.2. Obtenção das cervejas

As cervejas utilizadas neste trabalho, de origem portuguesa e espanhola, foram obtidas por conveniência, mediante disponibilidade comercial. Incluíram-se um total de onze cervejas, das quais nove são cervejas artesanais e duas são cervejas industriais (para efeitos de comparação) (Tabela 3). Das nove cervejas artesanais, cinco são de origem portuguesa e quatro de origem espanhola. As marcas comerciais das cervejas em estudo foram alvo de codificação.

Tabela 3 - Características das cervejas incluídas no estudo.

Tipo	Estilo	Código	Embalagem	Quantidade por embalagem (mL)	País de origem	Artesanal/ Industrial	
Ale	Milk Stout	EL-MS	Garrafa	330	Espanhola	Artesanal	
	Imperial Stout	EME-IS	Garrafa	330	Espanhola	Artesanal	
	Oatmeal Stout	ALM-OS	Garrafa	330	Portuguesa	Artesanal	
			EL-IPA	Garrafa	330	Espanhola	Artesanal
	India Pale Ale	ALM-IPA	Garrafa	330	Portuguesa	Artesanal	
			DC-IPA	Garrafa	330	Portuguesa	Artesanal
Lager		S-P <sup>#</sup>	Lata	330	Portuguesa	Industrial	
	Pilsner	EL-P	Garrafa	330	Espanhola	Artesanal	
		M-P	Garrafa	330	Portuguesa	Artesanal	
			S-MD <sup>#</sup>	Garrafa	250	Portuguesa	Industrial
	Munich Dunkel		B-MD	Garrafa	330	Portuguesa	Artesanal

<sup>#</sup>: Cerveja industrial.

#### 3.2.1. Tratamento prévio das cervejas

A preparação das cervejas realizou-se segundo o descrito por S. Silva et al. (2022), Labrado et al. (2020) e Censi et al. (2021), com ligeiras modificações. Iniciou-se com a homogeneização de cada embalagem durante 10 segundos com uma vareta de vidro, seguindo-se a desgaseificação por sonificação (Bandelin Sonorex<sup>®</sup>) durante 40 min a 35 kHz

à temperatura ambiente (S. Silva et al., 2022). De seguida, procedeu-se à desalcoolização das amostras, através de um evaporador rotativo (VWR IKA® RV8) a 40°C, 60 rpm e 900 mbar durante 1H (Labrado et al., 2020). Por fim, procedeu-se à liofilização (Labconco®) das cervejas à temperatura de -72°C e pressão de 0,070 mbar (Censi et al., 2021).

### 3.3. Análise química das amostras de cerveja

As cervejas em estudo (artesaniais e industriais) foram caracterizadas pela determinação de pH, acidez total e teor de açúcares redutores (TAR) e pelos dados disponíveis no rótulo da cerveja como a cor (expressa *European Brewery Convention* - EBC), amargor (expresso em *International Bitterness Units* - IBU) e teor alcoólico (expresso em percentagem), sempre que disponíveis pelo fabricante.

#### 3.3.1. Determinação do pH

A determinação do pH das cervejas em estudo realizou-se segundo S. Silva et al. (2022), com ligeiras modificações. O pH mediu-se em 15 mL de cerveja desgaseificada e desalcoolizada recorrendo-se a um medidor de pH (BANTE instruments 900®).

#### 3.3.2. Teor de acidez

A determinação do teor de acidez realizou-se por titulação potenciométrica, segundo o descrito por S. Silva et al. (2022). Assim, adicionou-se uma solução de NaOH a 0,1 M a 15 mL de cerveja desgaseificada e desalcolizada, até o pH igualar os 8,2. Os resultados foram expressos pela equação descrita abaixo (1).

$$\text{Teor de acidez (\% ácido láctico)} = \frac{\text{Volume (NaOH a 0,1M)} \times 0,9}{\text{Volume (cerveja alvo de análise)}} \quad (1)$$

#### 3.3.3. Teor de açúcares redutores (TAR)

A análise do TAR realizou-se segundo o método do DNS descrito por S. Silva et al. (2022), com ligeiras modificações. Começou-se pela preparação da solução de DNS a 1% através da dissolução de 1 g de DNS em 20 mL NaOH a 2 M, à qual se adicionou 30 g de Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, sendo a mistura diluída em 1 L de água destilada. De seguida, a 1 mL de amostra (cervejas ou glicose-controlo positivo) adicionou-se 1 mL de solução de DNS. Após agitação vigorosa em vórtex (VWR® ZX3), incubou-se a mistura em banho de água a 100°C, durante 5

min (Memmert® w-270). Posteriormente, seguiu-se o arrefecimento da mistura em banho de gelo, por 5 min. A absorvância foi lida a 540 nm em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR UV-1600PC). A curva de calibração foi construída recorrendo-se a soluções de diferentes concentrações de glicose (50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L). O TAR das amostras foi expresso em mg de equivalentes de glicose/L de amostra.

### **3.4. Determinação do TCF**

A determinação de TCF realizou-se pelo ensaio espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* segundo o descrito por Alves et al. (2010) e S. Silva et al. (2022), com algumas modificações. Ao abrigo da luz, a 250 µL de amostra (cervejas ou ácido gálgico-controlo positivo) foi adicionado 1,25 mL de reagente *Folin-Ciocalteu* a 0,2 M, deixou-se repousar por 5 min e adicionou-se 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 75 g/L e água destilada até perfazer 5 mL. Após incubação de 1H à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 760 nm em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR UV-1600PC). A curva de calibração foi construída recorrendo a soluções de diferentes concentrações de ácido gálgico (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálgico por grama de extrato (mg de GAE/g).

### **3.5. Determinação da capacidade antioxidante**

A determinação da capacidade antioxidante das cervejas em estudo realizou-se segundo os ensaios: ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FRAP e da atividade quelante de metais (também designado de ensaio da ferrozina).

#### **3.5.1. Ensaio do ABTS**

O ensaio ABTS realizou-se atendendo ao descrito por Petrón et al. (2021) e Censi et al. (2021), com ligeiras modificações. Iniciou-se pela formação do radical ABTS<sup>•+</sup>, através da reação do K<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> a 2,45 mM com o reagente ABTS a 7 mM (diluição em água), ao abrigo da luz, durante 12-16H. Diluiu-se a solução de ABTS<sup>•+</sup> em solução PBS até que a absorvância igualasse 0,70, a um comprimento de onda de 734 nm. De seguida, a 300 µL de amostra (concentração de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL) (cervejas ou trolox – controlo positivo) adicionou-se 2700 µL de ABTS<sup>•+</sup>. Após incubação de 30 min à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 734 nm, em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR

UV-1600PC) e os resultados foram expressos segundo a equação (2). Por fim, recorreu-se ao *software GraphPAD® Prism 8.0* para determinação do valor de IC<sub>50</sub>, expresso em µg/mL.

$$\text{Inibição de ABTS}^{\cdot+} (\%) = \frac{(\text{Absorvância do branco} - \text{Absorvância da amostra})}{\text{Absorvância do branco}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.5.2. Ensaio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O ensaio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguiu o descrito por Jayaprakasha et al. (2004) e Bhatti et al. (2015) com algumas modificações. A solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 40 mM foi preparada numa solução de tampão fosfato a 0,2 M (pH = 7,4). Ao abrigo da luz, misturou-se 1 mL de amostra (concentração de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL) (cervejas ou ácido ascórbico-controlado positivo) com 3 mL de tampão fosfato a 0,2 M e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após incubação de 10 min à temperatura ambiente, a absorvância leu-se a 230 nm, em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR UV-1600PC) e os resultados foram expressos pela equação (3). Por fim, recorreu-se ao *software GraphPAD® Prism 8.0* para determinação do valor IC<sub>50</sub>, expresso em µg/mL.

$$\text{Scavenging de H}_2\text{O}_2 (\%) = \frac{(\text{Absorvância do branco} - \text{Absorvância da amostra})}{\text{Absorvância do branco}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.5.3. Ensaio de determinação do valor de FRAP

O ensaio colorimétrico do FRAP realizou-se conforme o descrito por Censi et al. (2021) e Ulloa et al. (2017), com ligeiras modificações. O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 15 mL de solução tampão de acetato a 0,3 M (pH = 3,6), com 1,5 mL de solução de TPTZ a 10 mM (dissolvido em HCl a 40 mM) e 1,5 mL de solução de FeCl<sub>3</sub> a 20 mM. Adicionou-se 80 µL de amostra a 10 mg/mL (cervejas ou trolox-controlado positivo) a 2400 µL de reagente FRAP. Após incubação de 15 min em incubadora (Stuart® SI500) a 37°C e 5 min à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 593 nm, em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR UV-1600PC). Os resultados foram estimados por extrapolação por curva de calibração com trolox (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 µM) e expressos em µmol de trolox por grama de extrato (µmol de trolox/g).

### 3.5.4. Ensaio da atividade quelante de metais (ferrozina)

O ensaio da ferrozina executou-se segundo o descrito por S. Silva et al. (2022). Ao abrigo da luz, a 50 µL de amostra (cervejas ou EDTA – controlo positivo) adicionou-se 50 µL de solução de FeSO<sub>4</sub> a 0,15 mM. Após repouso de 5 min, ao abrigo da luz, adicionou-se 50 µL de ferrozina 0,5 mM. Seguiu-se uma homogeneização vigorosa e deixou-se repousar por 10 min à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 562 nm, em leitor de microplacas Thermoscientific® MULTISKA FC e os resultados expressos pela equação (4). Por fim, recorreu-se ao *software GraphPAD® Prism 8.0* para determinação do valor de IC<sub>50</sub>, expresso em µg/mL.

$$\text{Atividade Quelante (\%)} = \frac{(\text{Absorvância do controlo} - \text{Absorvância da amostra})}{\text{Absorvância do controlo}} \times 100 \quad (4)$$

### 3.6. Ensaio de determinação do potencial fotoprotetor

Para avaliar a capacidade de fotoproteção dos extratos em estudo realizaram-se os ensaios de determinação do FPS e da capacidade de absorção UV, *in vitro*.

#### 3.6.1. Determinação do FPS

A determinação do FPS realizou-se mediante Priyanka et al. (2018). Deste modo, preparou-se soluções aquosas de 1 mg/mL de cada amostra em estudo (cervejas).

Como controlo positivo recorreu-se a um protetor solar comercial (FPS = 50+), cuja preparação atendeu ao descrito por Dutra et al. (2004). Assim, diluiu-se 1 g de amostra em 100 mL de etanol absoluto, submetendo-se a solução a um banho de ultrassons (Bandelin Sonorex®) por 5 min. Posteriormente, a mistura foi filtrada por gravidade, utilizando-se como membrana filtrante o algodão cardado. Seguidamente, transferiu-se 5 mL do filtrado para um balão volumétrico de 50 mL e perpez-se com etanol absoluto. Transferiu-se 5 mL da solução preparada anteriormente para um balão volumétrico de 25 mL e perpez-se com etanol absoluto.

De seguida, uma porção de cada solução (cervejas e controlo positivo) foi alvo de medição em espectrofotómetro (Modelo VWR UV-1600PC) na gama de comprimentos de onda compreendida entre 290–320 nm (com incrementos de 5 nm). Os resultados foram expressos pela equação de Mansur et al. (1986) (5) (Priyanka et al., 2018). A relação entre o efeito eritematogénico e a intensidade da radiação encontra-se na tabela 4 (Sayre et al., 1978).

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (5)$$

CF: Fator de Correção. EE: Efeito Erimatogénico no comprimento de onda ( $\lambda$ ). I: Intensidade da radiação no comprimento de  $\lambda$ . Abs ( $\lambda$ ): Absorvância obtida experimentalmente em cada comprimento de onda.

Tabela 4 – Valores normalizados resultantes da relação do efeito erimatogénico (EE) e a intensidade da radiação por comprimento de onda (I), necessário ao cálculo dos valores de FPS. Adaptado de Sayre et al. (1978).

$\lambda$ (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0819
300	0,2674
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
$\sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda)$	1,000

### 3.6.2. Capacidade de absorção UV

A determinação da capacidade de absorção UV realizou-se segundo o descrito por Mejía-Giraldo et al. (2021) e Priyanka et al. (2018). Assim, 1 mg/mL de amostra (cerveja ou protetor solar comercial-controlado positivo) foram alvo de medição da absorvância numa gama de comprimentos de onda compreendidos entre 200 - 450 nm em espectrofotómetro UV-Vis (Modelo VWR UV-1600PC), com incrementos de 50 nm. Os resultados foram expressos segundo a equação (6).

$$\text{Coeficiente de absorção no UV} = \frac{(\text{Absorvância})}{\text{Concentração da amostra (mg/mL)}} \times 100 \quad (6)$$

### 3.7. Ensaios celulares

Para avaliar a capacidade de proteção dos extratos em estudo a nível celular, recorreu-se a um modelo de queratinócitos humanos, as células HaCaT. Estas derivam de queratinócitos humanos imortais e não tumorigénicas (Wilson et al., 2014). As células HaCaT

a utilizar, no presente estudo, foram gentilmente cedidas pela Doutora Francisca Rodrigues, LaQV REQUIMTE.

### 3.7.1. Manutenção da linhagem celular

As células HaCaT foram cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibiótico (ampicilina e estreptomicina) e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Advantage® - Lab AL01 – 01- 100) (Nagy et al., 2012). A manutenção das células HaCaT seguiu o que consta em Wilson et al. (2014) e Alnuqaydan et al. (2014), com ligeiras alterações. As células HaCaT foram cultivadas em meio de cultura na proporção de 1,0 X 10<sup>6</sup> células/mL. O meio de cultura foi mudado a cada dois dias, as subculturas foram realizadas a cada dois a três dias, assim que se atingiu 60/80% de confluência. Para a realização da subcultura, bem como de ensaios, iniciou-se pela lavagem das células HaCaT com 5 mL de PBS. Após a sua remoção adicionou-se 1 mL de tripsina a 0,25% + EDTA a 0,02%, incubou-se durante 8-10 min (até se observar destacamento celular) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, ao fim dos quais se adicionou 4 mL de meio de cultura.

### 3.7.2. Ensaio de avaliação da atividade metabólica

A atividade metabólica das células HaCaT foi avaliada pelo ensaio MTT. Começou-se pela inoculação das células HaCaT em placa de 96 poços (2,0 X 10<sup>4</sup> células/mL) durante 40H, após as quais se adicionou as amostras em estudo (cervejas) nas concentrações de 1-500 µg/mL, adaptado de Censi et al. (2021) e Oliveira et al. (2018). Como controlo negativo foi utilizado meio de cultura. Após 24H e 48H de incubação foi estimada a viabilidade celular pelo ensaio MTT, descrito por Mosmann (1983) e De la Cruz-Concepción et al. (2021), sujeitos a algumas modificações. Iniciou-se pela preparação de uma solução de MTT a 5 mg/mL em PBS. A cada micropoço de 100 µL adicionou-se 10 µL de MTT. Após incubação a 37°C durante 4H, os cristais de *formazano* formados foram dissolvidos em 100 µL de uma solução de DMSO com etanol absoluto (1:1). A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 570 nm, em leitor de microplacas Thermoscientific® MULTISKA FC. A percentagem de células com atividade metabólica foi expressa pela equação:

$$\text{Viabilidade celular\%} = \left( \frac{\text{Absorvância amostra}}{\text{Absorvância controlo}} \right) \times 100 \quad (7)$$

### **3.7.3. Incorporação dos extratos de cereja na cervejas artesanal mais promissora**

Após a análise dos resultados relativos à atividade antioxidante, fotoprotetora e de viabilidade celular foi selecionada a cerveja artesanal mais promissora para incorporação de extratos aquoso e etanólico de *Prunus avium* Lapins.

### **3.7.4. Obtenção e tratamento das cerejas**

As cerejas (*Prunus avium* Lapins) foram colhidas na região de Resende (Portugal) no mês de junho de 2023, sendo posteriormente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até utilização.

Para a preparação dos extratos de cereja, o pedúnculo e caroço foram removidos, sendo esta alvo de desidratação (AIGOSTAR 300005INI) à temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  até peso constante, reduzindo-se a pó, o resultado, por trituração (Taurus<sup>®</sup> Aromatic) durante 20–30 segundos. O pó foi armazenado, ao abrigo da luz, a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Nizioł-Łukaszewska, 2019).

### **3.7.5. Preparação do CA**

O extrato aquoso foi preparado segundo a técnica de infusão descrita por Bastos et al. (2015), com ligeiras alterações. Assim, a 1 g de cereja desidratada foi adicionado 10 mL de água fervente, deixando-se repousar por 5 min. De seguida, procedeu-se à filtração e liofilização (Labconco<sup>®</sup>) à temperatura de  $-72^{\circ}\text{C}$  e pressão de 0,070 mbar.

### **3.7.6. Preparação do CE**

O extrato etanólico foi preparado segundo o descrito por Horincar et al. (2020) alvo de modificações. Assim, a 1 g de cereja desidratada foi adicionada a 20 mL de etanol a 70% (m/m), submetidos a um banho de ultrassons (Bandelin Sonorex<sup>®</sup>) a  $40^{\circ}\text{C}$  por 30 min. A amostra foi filtrada por gravidade, usando como membrana filtrante o papel de filtro, e ao resíduo foi novamente adicionado o solvente. Foram realizadas três etapas de extração sucessivas, e as soluções filtradas foram reunidas. O solvente foi removido por evaporação no evaporador rotativo (VWR IKA<sup>®</sup> RV8) a  $40^{\circ}\text{C}$ , 60 rpm e 900 mbar durante 1H. Por fim, procedeu-se à liofilização (Labconco<sup>®</sup>) à temperatura de  $-72^{\circ}\text{C}$  e pressão de 0,070 mba.

### **3.7.7. Incorporação dos extratos de cereja na cerveja artesanal**

A adição decorreu segundo o descrito por Horincar et al. (2020) e Đorđević et al. (2016). Cada extrato foi adicionado, em condições assépticas, na concentração 1 mg/mL na garrafa da

cerveja em estudo, imediatamente fechada para maturação durante um dia a 10°C. De seguida as cervejas, foram alvo de desgaseificação e desalcoolização como descrito em 3.2.1, determinou-se o pH (secção 3.3.1), o teor de acidez (secção 3.3.2.) e TAR (secção 3.3.3.). Após liofilização, os extratos foram sujeitos à determinação do TCF (secção 3.4.), aos ensaios antioxidantes (secção 3.5.), fotoprotetores (secção 3.6.) e de viabilidade celular (secção 3.7.2.).

### **3.7.8. Ensaio de avaliação do efeito protetor da cerveja artesanal mais promissora isolada e após incorporação de extratos de cereja em células HaCaT, pelo ensaio de pré incubação**

Para avaliar a capacidade protetora da cerveja artesanal mais promissora isolada e após incorporação dos extratos de cereja, realizou-se o descrito por Oliveira et al. (2018), com modificações. Assim, as amostras (cerveja artesanal isolada, cerveja artesanal após incorporação de cereja ou quercetina a 50 µg/mL- controlo positivo) foram adicionadas às culturas celulares durante 5H. Como controlo negativo foi utilizado meio de cultura. De seguida, procedeu-se à sua remoção e à adição de meio de cultura, durante 16H (período de recuperação). Por fim, adicionou-se o *t*-BOOH a 5 mM, tóxico, durante um período de 2,5H, ao fim das quais se estimou a viabilidade celular pelo ensaio MTT.

### **3.8. Tratamento de dados**

Cada ensaio foi realizado em *triplicata*, pelo que os resultados obtidos foram apresentados no formato média ± desvio padrão. A análise estatística foi efetuada no *software GraphPAD® Prism 8.0*, recorrendo-se ao teste ANOVA *one-way* com o teste de comparações múltiplas *Tukey's*. O coeficiente de correlação entre as variáveis em estudo (TCF, atividade antioxidante e fotoproteção) foi determinado segundo a correlação de *Pearson*. Para comparação do benefício da incorporação dos extratos de cereja à cerveja artesanal mais promissora recorreu-se ao teste ANOVA *two-way* com o teste de comparações múltiplas *Tukey's*. As diferenças foram consideradas significativas com um valor de significância inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

#### **4. Resultados/ discussão**

No presente estudo foram estudadas 11 cervejas (portuguesas e espanholas) com seis estilos distintos (Milk Stout, Imperial Stout, Oatmeal Stout, India Pale Ale, Pilsner e Munich Dunkel).

Para a seleção das cervejas de origem portuguesa teve-se em consideração as cervejarias identificadas pela Associação de Cervejeiros em 2021, sendo estas selecionadas por conveniência mediante a acessibilidade com que se encontravam nas superfícies comerciais (Associação Cervejeiros de Portugal, 2021). Também no caso da seleção das cervejas de origem espanhola, decorreu por conveniência tendo em conta o disponível no mercado.

As cervejas industriais incluídas no presente estudo pertencem à mesma marca comercial, sendo ambas do tipo Lager. Para além destas duas cervejas, a marca possui no mercado duas outras cervejas de estilo Ale. Contudo, estas não apresentavam álcool na sua composição, sendo motivo pela sua não inclusão.

O fabrico de cervejas sem álcool apresenta diferenças no processo de fabrico que podem resultar em alterações do perfil volátil e fitoquímico. A produção de cervejas sem álcool pode ser realizada por processos físicos (evaporação ou membranas) ou biológicos (alterações no processo de brassagem, no processo fermentativo e utilização de leveduras especiais) (Burberg & Zarnkow, 2009; Salantă et al., 2020).

Neste sentido, a inclusão de cervejas industriais sem álcool poderia conferir uma desvantagem a este grupo, dado que as cervejas sem álcool apresentaram menor teor de polifenóis ( $366 \pm 73$  mg de GAE/L) e menor atividade antioxidante (FRAP =  $1525 \pm 217$   $\mu$ mol de sulfato ferroso/L) que cervejas com álcool, onde o teor de polifenóis variou entre  $452 \pm 86$  mg de GAE/L e  $875 \pm 168$  mg de GAE/L e a atividade antioxidante entre  $2172 \pm 157$   $\mu$ mol de sulfato ferroso/L e  $4663 \pm 863$   $\mu$ mol de sulfato ferroso/L (Piazzon et al., 2010). Pelo que a presença de álcool pode favorecer a extração/ disponibilidade destes compostos (Leitao et al., 2011).

#### 4.1. Análise físico-química das cervejas

A cor/turvação, amargor, teor alcoólico, pH, acidez, açúcares redutores, material de acondicionamento, composição e sabor são fatores importantes na classificação e caracterização dos diferentes estilos de cervejas, bem como na garantia de qualidade (Anderson et al., 2019; Caro et al., 2019; S. Silva et al., 2022). Deste modo, as cervejas alvo de estudo foram analisadas quanto às suas características físico-químicas (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise físico-química das cervejas em estudo.

Tipo	Estilo	Código	Valores tabelados			Valores experimentais		
			% de álcool (V/V)	EBC (cor)	IBU (amargor)	pH	Teor de Acidez (%)	TAR (mg de glicose/L)
Ale	Milk Stout	EL-MS	6,20	93	22	4,51 ± 0,01	0,25 ± 0,02	18548,75 ± 68,75
	Imperial Stout	EME-IS	<b>8,00</b>	SD	<b>98</b>	4,39 ± 0,01	0,28 ± 0,00	<b>22255,00 ± 25,00</b>
	Oatmeal Stout	ALM-OS	6,50	<b>98,2</b>	39,6	4,49 ± 0,01	<b>0,44 ± 0,01</b>	21646,67 ± 125,83
		EL-IPA	6,80	<b>7</b>	24	4,63 ± 0,00	0,33 ± 0,00	2767,50 ± 25,00
	India Pale Ale	ALM-IPA	6,50	17,5	67,9	4,69 ± 0,03	0,18 ± 0,00	21088,33 ± 143,80
		DC-IPA	4,50	SD	SD	4,12 ± 0,00	0,18 ± 0,00	3948,75 ± 118,75
Lager		S-P#	5,00	SD	SD	4,43 ± 0,01	<b>0,13 ± 0,01</b>	<b>1917,50 ± 75,00</b>
	Pilsner	EL-P	5,20	<b>7</b>	24	4,74 ± 0,01	0,19 ± 0,01	2967,50 ± 62,50
		M-P	4,50	SD	39	4,35 ± 0,00	0,20 ± 0,00	3259,17 ± 36,08
	Munich Dunkel	S-MD#	<b>4,10</b>	SD	SD	<b>3,89 ± 0,00</b>	<b>0,13 ± 0,01</b>	13346,67 ± 220,20
		B-MD	5,20	40	<b>20</b>	<b>4,78 ± 0,05</b>	0,37 ± 0,00	15000,83 ± 470,43

#: Cerveja industrial. SD: Sem Dados. EBC: *European Brewery Convention*. IBU: *International Bitterness Units*. %: Percentagem. TAR: Teor de Açúcares Redutores.

A cor é um parâmetro crucial na garantia da qualidade das cervejas, bem como na sua classificação, uma vez que é influenciada pelo tipo e quantidade de malte utilizados durante o processo de fabrico. Assim, maltes mais claros conferem à cerveja uma coloração pálida,

enquanto que maltes mais escuros (caramelizados e/ou torrados) conferem uma coloração mais escura (Caro et al., 2019). A nível europeu, a cor da cerveja é expressa em unidade da convenção cervejeira europeia (*European Brewery Convention – EBC*). Por outro lado, nos Estados Unidos da América, esta medida é expressa em método de referência padrão (*Standard Reference Method – SRM*). O valor de EBC ( $EBC = 25 \times \text{absorvância a } 430\text{nm} \times \text{fator de diluição}$ ) é cerca do dobro de SRM ( $SRM = 12,7 \times \text{absorvância a } 430\text{nm} \times \text{fator de diluição}$ ) (Figura 12) (Caro et al., 2019; Mitchell et al., 2021). Assim, se na escala SRM a cor da cerveja pode variar de 2 (cor palha) a 40+ (preto, opaco), prevê-se que na escala EBC esta variação decorra entre 4 e 80+ (Mitchell et al., 2021).



Figura 12 – Correlação entre a variação da cor da cerveja entre as escalas *Standard Reference Method* (SRM) e *European Brewery Convention* (EBC). Fonte: *VectorStock*®.

Nas cervejas artesanais os valores de EBC variaram entre 7 para EL-P (estilo Pilsner) e 98,2 para ALM-OS (estilo Oatmeal Stout). O valor de EBC da cerveja EME-IS (estilo Imperial Stout) apenas se encontrava disponível em formato qualitativo, classificando-se como “castanho- carvão”, que pode corresponder à designação “castanho muito escuro” na escala de SRM, com os valores compreendidos entre 30–35, com correspondência à escala de EBC 60–70 (Mitchell et al., 2021). Os dados referentes às cervejas industriais também se encontraram disponíveis na forma qualitativa, sendo a cerveja S-P (estilo Pilsner) considerada

“dourada” e a cerveja S-MD (estilo Munich Dunkel) “preta”. Segundo Mitchell et al. (2021), uma cerveja dourada apresenta um SRM entre 5 e 6 (equivalente 10–12 EBC) e uma cerveja preta apresenta um EBC 30+ (equivalente a 60+ EBC). No estudo de Bortoleto et al. (2022), o EBC das cervejas industriais variou entre 6–10 e nas cervejas artesanais variou entre 7–156. O mesmo se verificou no estudo de Rosales et al. (2021), onde o intervalo de variação do EBC das cervejas industriais (3,58 – 10,67 EBC) foi menor comparativamente às cervejas artesanais (4,77 – 28,18 EBC).

No presente estudo, observou-se um maior intervalo compreendido entre os EBC das cervejas artesanais, o que evidencia a ampla e complexa variedade de estilos e sabores, dada a sua correlação com aroma, neste género de cervejas, em comparação com as industriais (Bortoleto et al., 2022). Desta forma, cervejas mais claras (menor EBC) apresentam um aroma doce com notas de cereais, enquanto cervejas mais escuras exibem um aroma mais intenso, com notas de café, chocolate e torrado (Bortoleto et al., 2022).

As cervejas de coloração mais clara foram associadas a um maior teor de aminoácidos livres em comparação com as cervejas mais escuras (Poveda, 2019). Concluindo-se que o processo de torra do malte afeta o teor de aminoácidos (Poveda, 2019). São exemplos de aminoácidos livres encontrados nas cervejas artesanais o ácido L-glutâmico, L-arginina, e L-fenilalanina (Poveda, 2019).

O teor de amargor das cervejas é expresso em IBU, podendo variar entre 0 – 100 IBU (Burnham et al., 2018). O amargo é conferido essencialmente pelo lúpulo, dada a sua composição  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos (1 IBU = 1 mg de  $\alpha$ -ácidos isomerizados/L) (Burnham et al., 2018; Howe, 2020; Luo et al., 2020). No entanto, também os polifenóis presentes no malte e lúpulo influenciam o amargor da cerveja (Luo et al., 2020). Deste modo, a intensidade do amargor encontra-se correlacionado com o teor de iso- $\alpha$ -ácidos, cuja concentração é dependente do tipo de lúpulo, nível de desenvolvimento da planta, tempo, temperatura, métodos de extração e momento da adição (Bortoleto et al., 2022; Howe, 2020; Luo et al., 2020; L. Wang et al., 2022). O amargor é influenciado pela qualidade das matérias-primas, pelo processo fermentativo, pelas técnicas de fabrico e das interações dos diferentes constituintes (Luo et al., 2020). O fabrico de cervejas recorrendo à técnica *dry-hopped* (adições múltiplas de lúpulo seco, pós fervura, em várias fases do processo de fabrico) exibiu capacidade de aumentar as concentrações de ácidos amargos (humulonas, iso- $\alpha$ -ácidos, humulionas, tetra-iso- $\alpha$ -ácidos, xanthohumul, iso-xanthohumul, 8-prenilnariginina, 6-

prenilnarigina) e compostos aromáticos (octanoato de etilo, ácido octanoico, decanoato de etilo, linalol, (-)- $\alpha$ -terpineol, citrionelol e nerol) comparativamente a cervejas não fabricadas segundo esta técnica (Mitchell et al., 2021; L. Wang et al., 2022). Ambos os compostos com impacto no amargor percebido (L. Wang et al., 2022).

No presente estudo o teor de amargor variou entre 20 IBU para B-MD (estilo Munich Dunkel) e 98 IBU para EME-IS (estilo Imperial Stout) para as cervejas artesanais, sendo concordante com os estudos de Bortoleto et al. (2022) e de S. Silva et al. (2022) onde o teor de amargor variou entre 6 - 62 IBU e 13 - 80 IBU, respetivamente. No artigo de Rosales et al. (2021) as cervejas artesanais apresentaram teores de amargor mais baixos (7,25 - 28,58 IBU).

No estudo de S. Silva et al. (2022) as cervejas mais escuras apresentaram maior amargor. Contudo, no presente trabalho não se verificou essa linearidade. A cerveja EL-MS (estilo Milk Stout com 22 IBU) caracteriza-se pela sua doçura e menor amargor, apresentando a lactose como edulcorante (Mitchell et al., 2021). Deste modo, o baixo índice de amargor apresentado encontra-se de acordo com o que seria expectável, comparativamente a outras cervejas Stout, mais amargas (Mitchell et al., 2021). A composição da cerveja ALM-OS (estilo Oatmeal Stout), em aveia permite equilibrar a sua doçura e amargor, pelo que o seu teor de amargor também é notoriamente inferior à cerveja EME-IS (estilo Imperial Stout), incluída no estudo (Mitchell et al., 2021). Esta, por sua vez, é expectável que apresente amargor médio a agressivamente alto, que se reflete no seu teor de amargor de 98 IBU (Mitchell et al., 2021). A cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale, de coloração clara) destaca-se pelo segundo valor mais alto de IBU (67,9 IBU), sendo esta de estilo inglês, tal valor seria esperado (40-60), dado que este estilo se caracteriza pelo seu amargor (Mitchell et al., 2021). No estudo de Jardim et al. (2018) a cerveja IPA é a que apresenta maior IBU (46,15 IBU).

No presente estudo, o teor de amargor nas cervejas industriais não foi disponibilizado pela marca comercial. Contudo, é expectável que este possa variar entre 8-30 IBU, segundo os estudos de Bortoleto et al. (2022), Rosales et al. (2021) e S. Silva et al. (2022). O menor valor de IBU nas cervejas industriais pode advir da maior preferência do consumidor por cervejas menos amargas, permitindo um amplo consumo (Jardim et al., 2018; Rosales et al., 2021).

O maior teor em compostos amargos nas cervejas artesanais pode advir da maior concentração de isohumulona (mais amarga), enquanto que nas cervejas industriais predomina a isocohumulona (menos amarga) (Bortoleto et al., 2022; Caballero et al., 2012).

A percentagem de álcool foi igual a 4,10% (V/V) para S-MD (estilo Munich Dunkel) e 5,00% (V/V) para S-P (estilo Pilsner) nas cervejas industriais e variou entre 4,50% (V/V) para DC-IPA e M-P (estilos India Pale Ale e Pilsner, respetivamente) e 8,00% (V/V) para EME-IS (estilo Imperial Stout) nas cervejas artesanais. Denota-se um maior teor alcoólico nas cervejas artesanais comparativamente às cervejas industriais, tal como Bortoleto et al. (2022) verificou no seu estudo. Genericamente, o teor de álcool das cervejas comercializadas varia entre 4-6% (V/V), podendo atingir os 14% (V/V) ou até mesmo não apresentar álcool na sua composição (cervejas sem álcool) (Bamforth, 2002; Mitchell et al., 2021; S. Rossi et al., 2014). A produção de álcool depende da temperatura, levedura e da oxigenação do mosto (S. Rossi et al., 2014). Deste modo, a percentagem de álcool das cervejas em estudo encontram-se dentro do esperado, em concordância com os estudos de S. Silva et al. (2022) e Horn et al. (2021), onde o teor de álcool nas cervejas artesanais variou entre 4,1-11,6% (V/V) e 4-10% (V/V), respetivamente. O teor de álcool nas cervejas industriais variou entre 0-10% (V/V) no estudo de Tafulo et al. (2010) e entre 3,1-8,5% (V/V) no estudo de Zhao et al. (2010).

Nas cervejas do estilo IPA, a cerveja DC-IPA (estilo India Pale Ale com 4,5% V/V de etanol) apresenta um teor alcoólico inferior às restantes cervejas do mesmo estilo, dado que se assume como uma cerveja "session IPA" (de produção e consumo sazonais) e, por isso, tal como esperado, o seu teor alcoólico é inferior a 5% (V/V) (Mitchell et al., 2021).

O teor de álcool correlaciona-se com uma fermentação primária mais intensa, pelo que é expectável que cervejas de alta fermentação (cervejas Ale) apresentem maior teor alcoólico comparativamente às cervejas de baixa fermentação (cervejas Lager) (S. Rossi et al., 2014). Tal como se verifica no presente estudo, onde as cervejas Ale apresentam um teor de álcool compreendido entre 4,50-8,00% (V/V) e as cervejas Lager igual a 4,10-5,20% (V/V).

O efeito do álcool na saúde humana depende da quantidade consumida, frequência, do padrão de consumo e do tipo de bebida ingerida (Chiva-blanch & Badimon, 2020). O consumo moderado de álcool (igual ou inferior a 1 bebida/dia para mulheres e igual ou inferior a 2 bebidas/dia para homens) tem sido associado à redução de doenças cardiovasculares (doença coronária, acidente vascular cerebral isquémico) por aumentar os níveis de lipoproteína de alto peso molecular (HDL), apolipoproteína A1 (ApoA1), adiponectinas, modelação de marcadores oxidativos, reduzir lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL), pressão arterial, agregação plaquetária, níveis de fibrinogénio e marcadores inflamatórios (Chiva-blanch & Badimon, 2020; Nova et al., 2012). Além disso, a sensibilidade melhorada à

insulina reflete a diminuição do risco de desenvolvimento de diabetes tipo II (Nova et al., 2012). De forma particular, o consumo moderado de cerveja não só mostrou reduzir o risco de doenças cardiovasculares e de diabetes tipo II como aumentou densidade mineral óssea, com consequente diminuição de fraturas (Marcos et al., 2021).

Bortoleto et al. (2022) verificaram a correlação positiva do teor alcoólico com a cor tanto nas cervejas artesanais como industriais, constatando que cervejas mais escuras apresentaram maior teor alcoólico. Porém, no presente estudo o maior teor alcoólico não corresponde à cerveja mais escura.

O pH expressa a concentração de iões de hidrogénio em solução, sendo o seu valor variável ao longo do processo de fabricação da cerveja (Bamforth, 2001). O pH do mosto (fase inicial da produção) pode variar entre 5,0 e 5,6, denotando-se a sua diminuição durante o processo fermentativo da cerveja para valores que rondam os 4,3 e 4,6, baixos valores de pH podem interferir com o sabor da mesma (Eßlinger, 2009).

De acordo com os resultados do presente trabalho, constata-se que o pH variou entre  $3,89 \pm 0,00$  para cerveja S-MD (estilo Munich Dunkel) e  $4,78 \pm 0,05$  para a cerveja B-MD (estilo Munich Dunkel). Por sua vez, segundo Pai et al. (2015) os valores de pH da cerveja variam entre 3,90–4,20, enquanto para (Eßlinger, 2009) os valores podem variar entre 4,30 e 4,60.

Nas cervejas do tipo Ale este parâmetro variou entre  $4,12 \pm 0,00$  (cerveja DC-IPA, estilo India Pale Ale) e  $4,69 \pm 0,03$  (cerveja ALM-IPA, estilo India Pale Ale) e nas cervejas do tipo Lager entre  $3,89 \pm 0,00$  (cerveja S-MD, estilo Munich Dunkel) e  $4,78 \pm 0,05$  (cerveja B-MD, estilo Munich Dunkel), o que vai de encontro ao estudo de Anderson et al. (2019) onde o pH de cervejas do tipo Ale variou entre 3 e 6, enquanto nas cervejas do tipo Lager variou entre 4 e 5.

A variação do pH nas cervejas artesanais ocorreu entre  $4,12 \pm 0,00$  (cerveja DC-IPA, estilo India Pale Ale) e  $4,78 \pm 0,05$  (cerveja B-MD, estilo Munich Dunkel) e nas cervejas industriais foi igual a  $3,89 \pm 0,00$  (cerveja S-MD, estilo Munich Dunkel) e  $4,43 \pm 0,01$  (cerveja S-P, estilo Pilsner), concordante com o estudo de Rosales et al. (2021), onde o pH das cervejas artesanais variou entre  $3,45 \pm 0,01$  e  $4,47 \pm 0,03$  e das cervejas industriais entre  $3,43 \pm 0,10$  e  $4,45 \pm 0,19$ . A variação do pH nas cervejas artesanais também foi concordante com o artigo de Poveda (2019) ( $3,62 \pm 0,01$  –  $4,64 \pm 0,01$ ) e S. Silva et al. (2022) ( $4,27 \pm 0,03$  –  $4,92 \pm 0,02$ ). Denota-se a possibilidade de variação dos valores de pH entre lotes díspares, bem como entre amostras de diferentes marcas comerciais (Poveda, 2019). O valor de pH é um parâmetro

muito importante na estabilidade da cerveja, pois influencia o crescimento das leveduras, a velocidade de fermentação, síntese de álcool e desenvolvimento de contaminação bacteriana (Poveda, 2019). O crescimento de bactérias indesejadas não só provoca alterações do perfil organolético da cerveja, como contribui para o aparecimento de amins biogénicas (Poveda, 2019). As amins biogénicas são tóxicas para o Homem, uma vez que são metabolizadas pela monoamina oxidase, cuja presença se encontra inibida na presença de etanol (ou se administrados fármacos inibidores das monoaminas oxidase como a moclobemida). No estudo de Poveda (2019), as amins biogénicas identificadas na cerveja artesanal (0,0 – 5,7 mg/L) foram a histamina, tiramina, putrescina, triptamina, cadaverina, 2- feniletilamina e supermidine, encontrando-se o seu teor no limiar seguro (tóxicas para bebidas alcoólicas na concentração de 8 – 20 mg/L) (Poveda, 2019).

A acidez de uma cerveja encontra-se relacionada com a sensação ácida aquando do seu consumo, refletindo-se no menor pH (Gary Spedding, n. d.). A acidez é conferida pelos ácidos orgânicos e carbónicos dissolvidos na cerveja, pelo que só deve ser determinada após remoção do CO<sub>2</sub> (Buiatti, 2009; Gary Spedding, n. d.), tal como realizado no presente trabalho. É expectável que o teor de acidez, na cerveja, varie entre 0,1% e 0,3% de ácido láctico (Gary Spedding, n. d.). O aumento da acidez pode ser sugestivo de contaminação bacteriana, pelo que a sua determinação permite despistar essa alteração (Gary Spedding, n. d.). O teor de acidez das amostras incluídas no presente estudo variou entre 0,13 ± 0,01% (cerveja S-P e S-MD, estilo Pilsner e Munich Dunkel, respetivamente) e 0,44 ± 0,01% (cerveja ALM-OS, estilo Oatmeal Stout) de equivalentes de ácido láctico, próximo do esperado e, comparável aos resultados do estudo de S. Silva et al. (2022) (valores entre 0,10 ± 0,00 e 0,62 ± 0,01% de equivalentes de ácido láctico). Pai et al. (2015) determinaram o teor de acidez em cervejas indianas, tendo observado valores entre 0,0957 ± 0,0027 e 0,2252 ± 0,0% de equivalentes de ácido tartárico. Por sua vez, no estudo de Jardim et al. (2018) o teor de acidez de cervejas artesanais variou entre 1,49 g de ácido acético/L e 2,19 g de ácido acético/L.

O pH, a acidez, caracteres organoléticos e a estabilidade são condicionadas pela presença de ácidos orgânicos, cuja quantidade e tipo é influenciada pelo tipo de levedura, do processo de fabrico da cerveja e, conseqüentemente, pelo seu estilo (Černáa et al., 2023; Pai et al., 2015; Quitmann & Czermak, 2013). Foram identificados nas cervejas os ácidos tartárico, málico, acético, cítrico, sucínico e láctico (Černáa et al., 2023; Pai et al., 2015).

O pH e acidez são parâmetros cruciais na produção cervejeira, dada a sua influência nos parâmetros sensoriais, bem como o seu impacto na estabilidade biológica e química (Pai et al., 2015). De salientar que a acidez, juntamente com o baixo pH, a presença de CO<sub>2</sub>, o teor em álcool e a ausência de oxigênio durante o processo de fabrico das cervejas têm por função limitar o crescimento bacteriano, tornando a cerveja uma bebida microbiologicamente segura (Gary Spedding, n. d.).

Os açúcares redutores têm um papel preponderante no processo fermentativo e na estabilidade da cerveja condicionando o seu prazo de validade (Kunz et al., 2011; Pai et al., 2015). Deste modo, a sua determinação é importante na otimização e regulação do processo fermentativo, dada a sua influência positiva no rendimento e na qualidade das cervejas (Zhang et al., 2019). Os açúcares redutores de baixo peso molecular são utilizados pelas leveduras durante o processo fermentativo. Deste modo, apenas uma quantidade residual pode ser encontrada na cerveja final (Pai et al., 2015). São exemplo a glicose, frutose, maltose, sacarose e maltotriose (Kunz et al., 2011; Pai et al., 2015). Estes compostos atuam como agentes redutores, dado que possuem a capacidade de se oxidarem desencadeando a redução de outros compostos (Kunz et al., 2011; Zoecklein et al., 1990). Desta forma, o reagente DNS é adicionado em meio alcalino sob aquecimento, promovendo a oxidação dos açúcares redutores presentes nas amostras (Zhang et al., 2019).

No presente estudo, o TAR variou entre 1917,05 ± 75,00 mg de equivalentes de glicose/L (S-P, estilo Pilsner) e 22255,00 ± 25,00 mg de equivalentes de glicose/L (EME-IS, estilo Imperial Stout), o que equivale a 0,63 - 7,34 g de glicose por embalagem de 0,33L (apenas a embalagem de S-MD apresentava a capacidade de 0,25L). No estudo de Wu et al. (2024) o TAR na cerveja foi igual a 1,75 ± 0,01 g de equivalente de glicose/100mL (17500mg/L), estando dentro da faixa dos valores obtidos no presente trabalho. No estudo de S. Silva et al. (2022) o TAR variou entre 2598,0 ± 0,0 mg de equivalente de glicose/L e 4446,3 ± 31,1 mg de equivalente de glicose/L, apresentando TAR menores que os obtidos. Por sua vez, no artigo de Pai et al. (2015) o TAR da cerveja foi ainda mais reduzido, variando entre 0,469 ± 0,021 e 2,682 ± 0,008 mg de equivalentes de maltose/mL, o que equivale a 469 - 2682 mg de equivalentes de maltose/L. É de realçar que o TAR é superior nas cervejas do tipo Ale (2767,50 ± 25,00 - 22255,00 ± 25,00 mg de equivalentes de glicose/L) em comparação com as cervejas do tipo Lager (1917,50 ± 75,00 - 15000,83 ± 470,43 mg de equivalente de glicose/L), tal como esperado, tendo em conta que o teor alcoólico depende do TAR (S. Rossi

et al., 2014). O mesmo é corroborado por Choi et al. (2022) onde o TAR variou entre  $0,34 \pm 0,01 - 0,89 \pm 0,00\%$  para cervejas Ale e  $0,08 \pm 0,00 - 0,15 \pm 0,00\%$  para as cervejas Lager, resultados expressos em percentagem, através de reta de calibração de glicose.

O elevado teor de carboidratos na cerveja (92,1-16,3 mg/mL) provém essencialmente do malte de cevada rico em glicose, maltose, maltotriose, dextrinas e arabinosilanos (Pai et al., 2015). Gasinski et al. (2020) identificou/quantificou a presença de dextrina (34,60 g/L), maltotriose (0,24 g/L) e maltose (0,04 g/L) na cerveja.

Denota-se a maior variabilidade dos parâmetros químicos da cerveja artesanal, podendo tal estar associado à menor padronização do processo de fabrico destas em detrimento das cervejas industriais, entendido pelo consumidor como maior qualidade (Poveda, 2019; Rosales et al., 2021).

A qualidade das cervejas é, ainda, dependente das condições de armazenamento e transporte (Aguiar et al., 2022; Causmaecker et al., 2019). Condições desfavoráveis à preservação da qualidade das cervejas (aumento da temperatura, vibração durante o transporte e presença de oxigénio) intensificaram a cor, turvação (complexação de proteínas e flavonoides), níveis de aldeídos, características sensoriais associadas ao envelhecimento (substituição do aroma frutado pelo aroma a papelão, amargor áspero e persistente) e diminuição da concentração de *iso*- $\alpha$ -ácidos, *trans*-isocohumulona e *trans*-isohumulona (Aguiar et al., 2022; Causmaecker et al., 2019). Tais alterações relevam a pertinência da manutenção da temperatura estabelecida pelo fabricante (genericamente 7°C) e necessidade de uma correta escolha dos materiais de acondicionamento para amortecer as vibrações durante o transporte (Causmaecker et al., 2019).

As embalagens de acondicionamento primário também têm um papel fundamental na garantia de qualidade das cervejas, devendo evitar a degradação química, física e microbiológica durante o prazo de validade estabelecido (Aguiar et al., 2022). As embalagens comumente utilizadas pela indústria cervejeira são as garrafas de vidro, latas e barris de alumínio e garrafas de plástico (politereftalato de etileno- PET) (Europe Economics, 2020). As garrafas de vidro são as mais utilizadas na Europa, seguindo-se as latas de alumínio (Europe Economics, 2020). Tal encontra-se concordante com o presente estudo, onde apenas a cerveja S-P apresentava como embalagem primária uma lata de alumínio. Todas as outras cervejas encontravam-se em garrafas de vidro âmbar. A preferência por este tipo de embalagens encontra-se relacionada com a capacidade destes materiais (vidro e metal)

serem impermeáveis a gases, humidade e microrganismos, reutilizáveis e inertes (Aguiar et al., 2022). Ao contrário do vidro, o metal oferece maior resistência física. No entanto a preferência do consumidor europeu pelo vidro torna-o o material mais utilizado (Aguiar et al., 2022; Paternoster et al., 2017). No entanto, deve apresentar uma coloração que lhe permita a proteção da cerveja contra a luz, que não é possível se o vidro for transparente ou verde (Aguiar et al., 2022).

As garrafas de vidro, latas de alumínio e barris de aço inoxidável permitem manter o teor de CO<sub>2</sub>, cor, turvação e estabilidade de espuma dentro dos valores esperados durante o período de armazenamento, enquanto que as garrafas de plástico diminuem o teor de CO<sub>2</sub>, intensificam a cor e aumentam a turvação da cerveja (Lorencová et al., 2019). Em termos sensoriais, as latas e barris demonstraram maior capacidade de preservar as características da cerveja durante o período de armazenamento (Lorencová et al., 2019).

No artigo de Bratu et al. (2021), os autores estudaram o impacto das embalagens de vidro, alumínio e plástico na atividade antioxidante das cervejas. Para tal selecionaram dez marcas comerciais de cervejas comercializadas nos três tipos de embalagens, sempre que disponíveis (Bratu et al., 2021). Os autores constataram, pelo ensaio DPPH, a existência de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as cervejas acondicionadas nas diferentes embalagens (vidro > alumínio > plástico) (Bratu et al., 2021). Porém, no ensaio FRAP, os autores constataram que as cervejas armazenadas nas diferentes embalagens não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ) (vidro > plástico > alumínio) (Bratu et al., 2021). Para além disso, material de acondicionamento não demonstrou ter impacto no TCF (Bratu et al., 2021).

## 4.2. TCF das cervejas

O TCF foi determinado segundo o ensaio colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, baseado na transferência de elétrons entre os compostos fenólicos, presentes na amostra e o reagente *Folin-Ciocalteu*, reduzindo-o (Lamuela-Raventós, 2018; Pires et al., 2017). Em termos visuais, denota-se a alteração de cor de amarelo para azul (Lamuela-Raventós, 2018; Pires et al., 2017). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, uma vez que é o composto utilizado como referência (Pires et al., 2017). Na tabela 6 encontram-se os resultados relativos ao ensaio TCF.

Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos totais nas cervejas em estudo.

Tipo	Estilo	Código	TCF (mg de equivalentes GAE/g)
Ale	Milk Stout	EL-MS	7,95 ± 0,69 <sup>a</sup>
	Imperial Stout	EME-IS	4,62 ± 0,16 <sup>b</sup>
	Oatmeal Stout	ALM-OS	7,24 ± 0,40 <sup>a,c</sup>
		EL-IPA	7,32 ± 0,48 <sup>a,c,d</sup>
	India Pale Ale	ALM-IPA	<b>8,96 ± 0,64<sup>a,e</sup></b>
	DC-IPA	3,51 ± 0,16 <sup>b</sup>	
Lager		S-P <sup>#</sup>	5,17 ± 0,08 <sup>b,g</sup>
	Pilsner	EL-P	6,68 ± 0,00 <sup>c,d,f</sup>
		M-P	6,92 ± 0,24 <sup>a,c,d,f,h</sup>
	Munich Dunkel	S-MD <sup>#</sup>	6,29 ± 0,08 <sup>c,d,f,g,h</sup>
		B-MD	8,06 ± 0,56 <sup>a,c,d,e,h</sup>

<sup>#</sup>: Cerveja industrial.

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O TCF nas cervejas artesanais variou entre 3,51 ± 0,16 mg de GAE/g (cerveja DC-IPA, estilo India Pale Ale) e 8,96 ± 0,64 mg de GAE/g (cerveja ALM-IPA, India Pale Ale). O TCF das cervejas industriais foi 5,17 ± 0,08 mg de GAE/g para S-P (estilo Pilsner) e 6,29 ± 0,08 mg de

GAE/g para S-MD (estilo Munich Dunkel). Os valores obtidos são concordantes com os presentes na literatura, onde o TCF de cervejas, segundo Scioli et al. (2022) e Jastrzebski et al. (2007), variou entre  $3,21 \pm 0,07$  e  $9,33 \pm 0,33$  mg de GAE/g, respetivamente. Já no artigo de Censi et al. (2021) o TCF de cervejas artesanais italianas variou entre  $18,961 \pm 1,082$  mg de GAE/g e  $35,822 \pm 0,147$  mg de GAE/g, valores superiores aos obtidos. A discrepância dos valores pode ser justificada, por exemplo, pela utilização de marcas ou estilos diferentes e das próprias matérias-primas utilizadas na produção das cervejas. Outro fator que pode ter influenciado foi a inclusão de cervejas comerciais, estando estas sujeitas a diminuição do TCF ao longo do tempo. No entanto, nos estudos de Scioli et al. (2022) e Piva et al. (2021) (TCF =  $291,2 \pm 4,0$  µg/mL) os autores produzem a própria cerveja e o TCF é inferior aos do estudo de Censi et al. (2021).

O maior valor de TCF foi encontrado na cerveja ALM-IPA, uma cerveja clara, sendo concordante com o estudo de Breda et al. (2022), onde o maior valor de TCF foi encontrado numa cerveja clara ( $1,614 \pm 0,280$  g de GAE/L). Por outro lado, no estudo de S. Silva et al. (2022) a cerveja artesanal com maior valor de TCF foi uma cerveja escura do estilo Imperial Stout ( $2172,5 \pm 170,1$  mg de GAE/L), concordante com o estudo de D. R. Marques et al. (2017) onde, também, uma cerveja artesanal escura, estilo Brown Porter, apresentou maior TCF ( $48,5 \pm 0,19$  mg de GAE/L). No estudo de Piazzon et al. (2010) a cerveja com maior TCF foi uma cerveja escura do estilo Bock ( $875 \pm 168$  mg de GAE/L).

Como mencionado, a cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale) apresentou o maior TCF, seguindo-se as cervejas B-MD (estilo Munich Dunkel) e ELM-MS (estilo Milk Stout), com um TCF de  $8,06 \pm 0,56$  e  $7,95 \pm 0,69$  mg de GAE/g, respetivamente (sem diferenças estatisticamente significativas entre ALM-IPA e B-MD). O maior TCF nas cervejas de coloração escura pode advir da correlação encontrada entre a cor do malte e à atividade biológica, no estudo de Shopska et al. (2021), no qual os maltes mais escuros (alvo de maior tratamento térmico) apresentaram maior TCF e atividade antioxidante.

Os menores valores de TCF correspondem a duas cervejas artesanais, DC-IPA (estilo India Pale Ale, TCF =  $3,51 \pm 0,16$  mg GAE/g) e EME-IS (estilo Imperial Stout, TCF =  $4,62 \pm 0,16$  mg GAE/g), ao contrário do verificado noutros estudos, nomeadamente no estudo de S. Silva et al. (2022) onde as cervejas industriais apresentaram menores valores de TCF ( $255,3 \pm 69,6$  mg de GAE/L), comparativamente às artesanais ( $343,8 \pm 22,2 - 2172,5 \pm 170,1$  mg de GAE/L). Também noutros estudos, o TCF das cervejas artesanais foi superior às industriais. Desta

forma, no estudo de F. Rossi et al. (2021) o TCF da cerveja artesanal foi 671,7 mg/L e da cerveja industrial foi 479 mg/mL. No estudo de Rosales et al. (2021), o TCF das cervejas artesanais variou entre  $288,10 \pm 57,78$  mg de GAE/L e  $469,21 \pm 67,84$  mg de GAE/L e das cervejas industriais entre  $243,87 \pm 35,95$  mg de GAE/L e  $399,71 \pm 20,75$  mg de GAE/L. Tais diferenças podem advir do processo de fabrico, dado que as cervejas artesanais, de forma genérica, não são sujeitas a etapas de pasteurização e filtração, além de incorporarem matérias-primas de elevada qualidade (Villacreces et al., 2022). Ainda assim, no presente trabalho as cervejas industriais apresentam valores de TCF significativamente inferiores das cervejas artesanais do mesmo estilo ( $p < 0,05$ ).

O estilo Imperial Stout apresentou os valores mais altos de TCF, no estudo de S. Silva et al. (2022), ao contrário do que se verifica no presente estudo. Além da diferente marca comercial usada nos dois estudos, destaca-se a origem distinta, dado que no estudo de S. Silva et al. (2022) as cervejas eram portuguesas e a cerveja EME-IS é espanhola.

No estilo Stout, a cerveja espanhola EME-IS (estilo Imperial Stout) difere significativamente da cerveja espanhola EL-MS (estilo Imperial Stout) e da cerveja portuguesa ALM-OS (estilo Oatmeal Stout) ( $p < 0,05$ ). Por sua vez, no estilo IPA a cerveja espanhola (EL-IPA) é significativamente superior à cerveja portuguesa DC-IPA ( $p < 0,05$ ) e significativamente inferior à outra cerveja portuguesa, ALM-IPA ( $p < 0,05$ ). Neste sentido, a influência da origem das cervejas no TCF é pouco clara.

O valor elevado de TCF da cerveja EL-MS, encontrado no presente trabalho, pode advir da presença de coco na sua composição. No seu estudo de Mahayothee et al. (2016) determinaram o TCF na água (entre  $5,18 \pm 0,51$  mg de GAE/100 mL e  $7,17 \pm 0,03$  mg de GAE/100 mL) e polpa de coco (entre  $6,82 \pm 0,03$  mg de GAE/100g e  $10,01 \pm 0,15$  mg de GAE/100g) (Mahayothee et al., 2016).

As diferenças encontradas entre cervejas do mesmo estilo e de marcas comerciais disparem seriam esperadas tendo em conta as diferentes técnicas de fabrico, a variabilidade do mesmo e as diferentes matérias-primas (variedade, origem geográfica, colheita e, conseqüente TCF) (Piazzon et al., 2010; Poveda, 2019).

### 4.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de um composto pode ser desempenhada pela quelação de íons metálicos e pela neutralização de ROS quer pela doação de átomos de hidrogénio ou de elétrões, o que enfatiza a necessidade de serem realizados vários ensaios antioxidantes, tendo em conta os diferentes mecanismos (Atta et al., 2017; Baek & Lee, 2016; Zhao, 2014). O ensaio ABTS permite aferir a capacidade antioxidante quanto à capacidade do extrato em neutralizar o respetivo radical pela transferência de elétrões ou pela transferência de átomos de hidrogénio (Munteanu & Apetrei, 2021; Siddeeg et al., 2021). Por sua vez, o ensaio  $H_2O_2$  possibilita a determinação do potencial antioxidante do extrato pela neutralização da espécie não radicalar pela transferência de átomos de hidrogénio (Siddeeg et al., 2021). O ensaio da quelação de íons metálicos (ferrozina) avalia a capacidade do extrato em quelar íons metálicos (Adjimani & Asare, 2015). E, o ensaio FRAP estima a capacidade do extrato em doar elétrões (Siddeeg et al., 2021; Zhao, 2014). Os ensaios mencionados baseiam-se na técnica espectrofotométrica, são sensíveis e rápidos (Zhao, 2014).

O ensaio ABTS é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a capacidade antioxidante de um extrato através da sua capacidade de neutralizar o radical  $ABTS^{\cdot+}$ , pela transferência de elétrões ou átomos de hidrogénio (Alam et al., 2013; Munteanu & Apetrei, 2021). Deste modo, tendo o  $ABTS^{\cdot+}$  uma coloração azul – esverdeada, a sua neutralização resulta na perda de coloração e, conseqüentemente, na diminuição da absorvância (Alam et al., 2013; Munteanu & Apetrei, 2021). Na tabela 7 encontram-se os  $IC_{50}$  determinados para as amostras em estudo, que variaram entre  $38,74 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$  (DC-IPA, estilo India Pale Ale) e  $108,98 \pm 5,44 \mu\text{g/mL}$  (EME-IS, estilo Imperial Stout) nas cervejas artesanais e, foram iguais a  $114,56 \pm 5,47 \mu\text{g/mL}$  e  $123,85 \pm 6,81 \mu\text{g/mL}$  para as cervejas industriais S-P (estilo Pilsner) e S-MD (estilo Munich Dunkel), respetivamente.

Tabela 7 – Atividade antioxidante das cervejas, segundo os ensaios de ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferrozina e FRAP.

Estilo	Código	ABTS (IC <sub>50</sub> µg/mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> µg/mL)	Ferozina (IC <sub>50</sub> µg/mL)	FRAP (µmol de equivalentes de trolox/g)
Controlo Positivo		2,05 ± 0,03 (Trolox)	1,37 ± 0,02 (Ácido ascórbico)	5,50 ± 0,03 (EDTA)	Não aplicável
Milk Stout	EL-MS	74,20 ± 4,37 <sup>*,a</sup>	33,79 ± 0,82 <sup>*,a</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	43,16 ± 3,37 <sup>a</sup>
Imperial Stout	EME-IS	108,98 ± 5,44 <sup>*,b</sup>	36,04 ± 2,57 <sup>*,a,b</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	33,98 ± 2,21 <sup>b</sup>
Oatmeal Stout	ALM-OS	87,94 ± 3,82 <sup>*,c</sup>	34,28 ± 2,24 <sup>*,a,b,c</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	50,91 ± 0,70 <sup>c</sup>
	EL-IPA	83,27 ± 0,21 <sup>*,a,c,d</sup>	31,60 ± 1,05 <sup>*,a,b,c,d</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	40,56 ± 3,07 <sup>a,b</sup>
India Pale Ale	ALM-IPA	55,21 ± 4,68 <sup>*,g</sup>	23,54 ± 1,53 <sup>*,h</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	53,74 ± 1,27 <sup>c,e</sup>
	DC-IPA	38,74 ± 0,47 <sup>*,h</sup>	13,85 ± 1,30 <sup>*,i</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	47,77 ± 1,63 <sup>a,c,f</sup>
	S-P <sup>#</sup>	114,56 ± 5,47 <sup>*,b,e</sup>	50,92 ± 3,24 <sup>*,e</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	27,57 ± 1,57 <sup>i</sup>
Pilsner	EL-P	84,30 ± 4,27 <sup>*,a,c,d,f</sup>	40,92 ± 1,34 <sup>*,b,c,f</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	34,24 ± 0,77 <sup>b</sup>
	M-P	101,71 ± 0,90 <sup>*,b</sup>	39,80 ± 0,99 <sup>*,a,b,c,f,g</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	41,74 ± 0,13 <sup>a,b,g</sup>
	S-MD <sup>#</sup>	123,85 ± 6,81 <sup>*,e</sup>	50,65 ± 5,04 <sup>*,e</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	46,67 ± 0,13 <sup>a,c,f,g,h</sup>
Munich Dunkel	B-MD	80,66 ± 4,11 <sup>*,a,c,d,f</sup>	37,82 ± 1,23 <sup>*,a,b,c,d,f,g</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	48,94 ± 1,13 <sup>c,e,f,h</sup>

<sup>#</sup>: Cerveja industrial.

ABTS: Ensaio do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Ensaio do peróxido de hidrogénio. IC<sub>50</sub>: Concentração capaz de inibir em 50%. FRAP: Ensaio de determinação do poder antioxidante da redução do ião férrico.

\*Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo positivo.

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Todos valores de  $IC_{50}$  são significativamente superiores ao controlo positivo ( $IC_{50} = 2,05 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, cerveja DC-IPA (estilo India Pale Ale) classifica-se como tendo uma atividade antioxidante alta ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), as cervejas EL-MS (estilo Milk Stout), ALM-OS (estilo Oatmeal Stout), EL-IPA (estilo India Pale Ale), ALM-IPA (estilo India Pale Ale), EL-P (estilo Pilsner) e B-MD (estilo Munich Dunkel) exibem atividade antioxidante moderada ( $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e as cervejas EME-IS (estilo Imperial Stout), S-P (estilo Pilsner), M-P (estilo Pilsner) e S-MD (estilo Munich Dunkel) apresentam baixa atividade antioxidante ( $IC_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Kuethe & Efferth, 2010).

A cerveja DC-IPA é a que apresenta melhor capacidade de neutralização do radical  $ABTS^{\cdot+}$  ( $p < 0,05$ ), tal não seria o esperado dado que foi a cerveja que apresentou menor TCF, o que evidencia a presença de outros compostos com potencial antioxidante, que não compostos fenólicos, como por exemplo melanoidinas ou os sulfitos (Zhao et al., 2012).

Por outro lado, a cerveja EME-IS (estilo Imperial Stout) apresentou o segundo TCF mais baixo, concordante com o maior valor de  $IC_{50}$  para as cervejas artesanais. No caso da cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale), esta possui o segundo melhor valor de  $IC_{50}$ , concordante com o melhor valor de TCF. As cervejas industriais apresentaram os valores de  $IC_{50}$  mais altos e, por isso, menor capacidade de neutralizar o radical  $ABTS^{\cdot+}$ .

O facto de uma cerveja clara apresentar a melhor capacidade de neutralização do radical  $ABTS^{\cdot+}$  é concordante com o estudo de Breda et al. (2022), onde a capacidade de neutralizar o radical  $ABTS^{\cdot+}$  variou entre  $1,142 \pm 0,025 - 10,913 \pm 0,305$  mmol de trolox /L, valores superiores ao determinado por Gasinski et al. (2020) ( $0,97 \pm 0,07$  mmol de trolox/L). No estudo de Censi et al. (2021) o valor de  $IC_{50}$  de cervejas artesanais italianas variou entre  $28,452 \pm 1,507 \mu\text{mol}$  de trolox/g e  $43,687 \pm 3,506 \mu\text{mol}$  de trolox/g.

Salienta-se que entre cada estilo as cervejas apresentam diferenças significativas entre si, o que mais uma vez apoia as diferenças inerentes ao processo de fabrico consoante a marca comercial (Piazzon et al., 2010; Poveda, 2019; Zhao et al., 2010). Além disso, o impacto da origem na capacidade de neutralização do radical  $ABTS^{\cdot+}$  não é clara. No que diz respeito ao estilo Stout, a cerveja EL-MS (espanhola) é a que apresenta melhor valor de  $IC_{50}$ . No entanto, a cerveja EME-IS (espanhola) apresenta um valor de  $IC_{50}$  elevado. No estilo IPA, as duas cervejas portuguesas (ALM-IPA e DC-IPA) exibem os menores valores de  $IC_{50}$ . Por último, no estilo Pilsner é a cerveja espanhola (EL-P) a que apresenta melhor capacidade antioxidante.

O ensaio do  $H_2O_2$  baseia-se na capacidade de um agente antioxidante (extrato em estudo) neutralizar a espécie não radicalar ( $H_2O_2$ ), impedindo que esta forme os radicais hidroxilo ( $OH\cdot$ ), iniciadores da peroxidação lipídica e de danos no DNA (Alam et al., 2013).

O valor de  $IC_{50}$  das cervejas artesanais variou entre  $13,85 \pm 1,30 \mu g/mL$  (DC-IPA, estilo India Pale Ale) e  $40,92 \pm 1,34 \mu g/mL$  (EL-P, estilo Pilsner) e das cervejas industriais foi igual a  $50,92 \pm 3,24 \mu g/mL$  para S-P (estilo Pilsner) e  $50,65 \pm 5,04 \mu g/mL$  para S-MD (estilo Munich Dunkel) (Tabela 7). À semelhança do ensaio ABTS, todos os valores de  $IC_{50}$  são significativamente superiores ao controlo positivo ( $IC_{50} = 1,37 \pm 0,02 \mu g/mL$ ) ( $p < 0,05$ ). Porém, neste ensaio todas as cervejas apresentam atividade antioxidante alta ( $IC_{50} < 50 \mu g/mL$ ), segundo Kuete & Efferth (2010), incluindo as cervejas industriais. No entanto, estas apresentam valores de  $IC_{50}$  significativamente superiores às cervejas artesanais, sem diferenças entre si ( $p < 0,05$ ), evidenciam menor capacidade antioxidante, em conformidade com o ensaio ABTS.

Concordante com o ensaio ABTS, a cerveja DC-IPA (estilo India Pale Ale) é a que exhibe melhor capacidade de neutralizar o radical  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ), apesar do TCF, apoiando a hipótese da existência de outros compostos, além dos compostos fenólicos, com atividade antioxidante. Segue-se a cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale) com o segundo melhor valor de  $IC_{50}$  ( $p < 0,05$ ), concordante com o maior valor de TCF. Ao contrário dos ensaios TCF e ABTS, a cerveja EL-IPA (estilo India Pale Ale) apresenta o terceiro melhor valor de  $IC_{50}$ .

A cerveja EME-IS (estilo Imperial Stout) apesar de ter apresentado um dos valores de TCF mais baixo, elevado valor de  $IC_{50}$  no ensaio ABTS, não apresenta diferenças significativas com as cervejas EL-MS (estilo Milk Stout) e B-MD (estilo Munich Dunkel), que se revelaram mais promissoras no TCF e na neutralização do radical  $ABTS^{\cdot+}$ .

Quanto ao impacto da marca comercial e da origem das cervejas na atividade antioxidante das mesmas, no estilo Stout e Pilsner as cervejas artesanais não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Já no estilo IPA, as cervejas apresentam diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ), sendo as cervejas de origem portuguesa as que exibem melhor capacidade antioxidante (Piazzon et al., 2010; Poveda, 2019; Zhao et al., 2010).

Até onde se conhece nenhum artigo realiza o ensaio  $H_2O_2$  em cervejas, o que impossibilita comparações. Neste sentido, salienta-se a necessidade de aumentar a robustez de informação em relação à capacidade de as cervejas neutralizarem a espécie não radicalar em causa, dado este constituir uma espécie endógena (Y. Wang et al., 2018).

O ensaio da atividade quelante de metais, comumente designado por ferrozina, baseia-se na capacidade do agente antioxidante (extrato) em quelar o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), impedindo a sua oxidação a íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e, conseqüentemente, a síntese do radical hidroxilo ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot$ ) (Adjimani & Asare, 2015; Y. Wang et al., 2018). Em termos laboratoriais, um extrato com a capacidade de quelação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  impede que este forme complexos com a ferrozina de cor avermelhada (Adjimani & Asare, 2015).

A impossibilidade de determinar a concentração de extrato de cerveja necessária para quelar 50% dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  significa que o valor  $\text{IC}_{50}$  é superior à concentração máxima testada (1 mg/mL). Desta forma, tendo em conta o descrito por Kuete & Efferth (2010) todos os extratos, para o mecanismo antioxidante em estudo, apresentam atividade antioxidante baixa  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ .

No estudo de S. Silva et al. (2022) a capacidade de quelação de íons metálicos de cervejas artesanais variou entre  $1,6 \pm 0,4 \%$  e  $113,4 \pm 15,8\%$ , o facto da maioria das cervejas em estudo apresentar baixas percentagens de quelação dos íons metálicos corrobora a impossibilidade de cálculo do valor de  $\text{IC}_{50}$ . No estudo de Scioli et al. (2022), também, não foi possível verificar a existência de resultados quantitativos relativos à atividade quelante de metais.

O facto da cerveja apresentar na sua composição íons  $\text{Fe}^{2+}$  (0,12 mg/L), estes podem ser alvo de quelação pelos compostos com propriedades antioxidantes presentes na cerveja (Ferreira et al., 2023). Deste modo, quando, laboratorialmente, se pretende determinar a capacidade de quelação de íons metálicos na forma de sulfato ferroso, a cerveja pode apresentar a sua capacidade diminuída, não sendo por isso passível de ser determinado o valor de  $\text{IC}_{50}$  (Ferreira et al., 2023).

O ensaio de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP, consiste na redução de  $\text{Fe}^{3+}$ , presente no complexo 2,4,6- tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), a  $\text{Fe}^{2+}$  pela transferência de eletrões (Urrea-Victoria et al., 2016). Em termos colorimétricos, verifica-se a alteração de cor de roxo-claro para roxo- intenso (Urrea-Victoria et al., 2016).

Os valores de FRAP variaram entre  $33,98 \pm 2,21 \mu\text{mol}$  de trolox/g (EME-IS, estilo Imperial Stout) e  $53,74 \pm 1,27 \mu\text{mol}$  de trolox/g (ALM-IPA, estilo India Pale Ale) para as cervejas artesanais e foi igual a  $27,57 \pm 1,57 \mu\text{mol}$  de trolox/g para S-P (estilo Pilsner) e  $46,67 \pm 0,13 \mu\text{mol}$  de trolox/g para S-MD (estilo Munich Dunkel).

A cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale) exibiu o maior poder redutor, apesar de não ser significativamente diferente da cerveja ALM-OS (estilo Oatmeal Stout). Seguiu-se a cerveja B-MD (estilo Munich Dunkel).

Apesar da cerveja S-P (estilo Pilsner), uma cerveja industrial, apresentar o menor poder redutor ( $p < 0,05$ ), o mesmo não acontece com a cerveja industrial S-MD (estilo Munich Dunkel) que possui o quinto poder redutor mais elevado, equiparando-se às cervejas artesanais.

Dentro de cada estilo constata-se a presença de diferenças estatisticamente significativas entre as respetivas cervejas, verificando que no estilo Stout a cerveja ALM-OS (portuguesa) e EL-MS (espanhola) exibem melhor poder redutor que EME-IS (espanhola). No estilo IPA, as cervejas portuguesas (ALM-IPA e DC-IPA) superam a cerveja EL-IPA (espanhola). No estilo Pilsner a cerveja artesanal portuguesa (M-P) demonstra maior poder redutor que a cerveja EL-P (espanhola).

No estudo de Censi et al. (2021), o poder redutor de cervejas artesanais italianas variou entre  $104,046 \pm 7,680 \mu\text{mol de trolox /g}$  e  $125,159 \pm 1,237 \mu\text{mol de trolox /g}$ , valores muito superiores aos obtidos. Tal facto pode advir de os autores produzirem as cervejas em estudo, estando estas expostas a condições controladas e, por isso, poder haver predominância dos iões  $\text{Fe}^{2+}$  (Ferreira et al., 2023). No presente estudo, as cervejas foram adquiridas comercialmente e, apesar de se encontrarem disponíveis ao público e dentro do prazo de validade, podem estar sujeitas a reações de oxidação natural mediante as condições a que estiveram expostas. Deste modo, os compostos fenólicos da cerveja podem, de forma natural, reduzir os iões  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , pelo que esta pode ver diminuída a capacidade de reduzir o reagente TPTZ. No artigo de Ferreira et al. (2023), após processos de envelhecimento natural da cerveja ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 90 e 180 dias), a concentração de iões  $\text{Fe}^{2+}$  diminuiu. Porém, a presença de iões  $\text{Fe}^{3+}$ , apenas foi detetada em condições forçadas de envelhecimento ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 7 e 14 dias).

No estudo de Chacón-Figueroa et al. (2022), o poder redutor de uma cerveja artesanal foi igual a  $4,36 \pm 0,49 \mu\text{Mol trolox/g}$  e no de Scioli et al. (2022) foi igual a  $7,94 \pm 0,25 \text{ mg de trolox/g}$ .

Ressalva-se que, à semelhança do TCF, o potencial antioxidante das cervejas EL-MS e ALM-OS pode-se encontrar relacionado com a adição de outros compostos/ alimentos/ extratos, nomeadamente de coco, alcachofra e figo preto, respetivamente. No estudo de Mahayothee et al. (2016) a água e polpa de coco demonstraram potencial antioxidante pelo

ensaio ABTS, variando entre  $2,98 \pm 0,94 \mu\text{M}$  de trolox /mL e  $4,55 \pm 0,73 \mu\text{M}$  de trolox /mL e  $4,00 \pm 0,28 \mu\text{M}$  de trolox /g e  $7,54 \pm 0,31 \mu\text{M}$  de trolox /g de extrato fresco, respetivamente. No estudo Ben Salem et al. (2017), as folhas de alcachofra demonstraram atividade antioxidante superior em extratos etanólicos comparativamente a extratos aquosos pelo ensaio FRAP ( $315,91 \pm 8,36 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  no extrato aquoso e  $527,79 \pm 16,26 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$  no extrato etanólico) e ABTS ( $210,74 \pm 8,36 \text{mmol trolox}/\text{g}$  no extrato aquoso e  $499,43 \pm 39,73 \text{mmol de trolox}/\text{g}$  para o extrato etanólico) (Ben Salem et al., 2017). Por sua vez, no estudo de P. Marques et al. (2017) o extrato aquoso de alcachofra reduziu  $92,8 \pm 1\%$  de ROS despoletados pela exposição de células HaCaT a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por fim, no estudo de Bayrak et al. (2023) o figo roxo-escuro apresentou poder redutor do ferro igual a  $372,97 \pm 35,20 \mu\text{mol de FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$  de extrato fresco, tendo sido esta atividade superior nos figos roxo e nos verdes (Bayrak et al., 2023).

## 4.4. Atividade fotoprotetora

### 4.4.1. FPS

A determinação espectrofotométrica do FPS trata-se de um método *in vitro* económico, de fácil execução, reprodutível e preciso (Zou et al., 2022). Na tabela 8 encontram-se os valores de FPS para as cervejas em estudo.

Tabela 8 – Fator de proteção solar das cervejas.

Estilo	Código	FPS
Controlo positivo		134,21 ± 0,45
Milk Stout	EL-MS	25,13 ± 0,34* <sup>a</sup>
Imperial Stout	EME-IS	38,97 ± 0,22* <sup>b</sup>
Oatmeal Stout	ALM-OS	46,76 ± 0,25* <sup>c</sup>
	EL-IPA	23,53 ± 0,70* <sup>a, d</sup>
India Pale Ale	ALM-IPA	48,85 ± 0,39* <sup>c</sup>
	DC-IPA	7,00 ± 0,08* <sup>f</sup>
	S-P <sup>#</sup>	16,06 ± 0,20* <sup>e</sup>
Pilsner	EL-P	22,30 ± 2,18* <sup>d</sup>
	M-P	17,41 ± 0,69* <sup>e</sup>
	S-MD <sup>#</sup>	37,28 ± 0,81* <sup>b</sup>
Munich Dunkel	B-MD	42,55 ± 0,04* <sup>g</sup>

<sup>#</sup>: Cerveja industrial.

\*Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo positivo. As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O FPS variou entre 7,00 ± 0,08 (DC-IPA, estilo India Pale Ale) e 48,85 ± 0,39 (ALM-IPA, estilo India Pale Ale) para as cervejas artesanais ( $p < 0,05$ ), sendo concordante com as cervejas que apresentaram menor e maior TCF. Em concordância, a cerveja B-MD (estilo Munich Dunkel) apresentou o segundo melhor TCF que se reflete no terceiro melhor FPS. No caso da

cerveja EME-IS (estilo Imperial Stout), esta apresentou um dos menores TCF e em contrapartida apresenta o quarto melhor FPS.

A cerveja portuguesa ALM-OS (estilo Oatmeal Stout) supera os FPS das cervejas espanholas EME-IS (estilo Imperial Stout) e EL-MS (estilo Milk Stout), ALM-IPA (estilo India Pale Ale de origem portuguesa) supera EL-IPA (estilo India Pale Ale de origem espanhola) e DC-IPA (estilo India Pale Ale de origem portuguesa), e EL-P (estilo Pilsner de origem espanhola) supera M-P (estilo Pilsner de origem portuguesa), denotando-se diferenças entre as diferentes marcas comerciais e origens ( $p < 0,05$ ). O estilo Pilsner, de forma genérica, aparenta ser o menos promissor no que concerne à atividade fotoprotetora.

O FPS das cervejas industriais foi igual a  $16,06 \pm 0,20$  e  $37,28 \pm 0,81$  para as cervejas S-P (estilo Pilsner) e S-MD (estilo Munich Dunkel), respetivamente. É de salientar que o FPS de S-MD (estilo Munich Dunkel, industrial) é o quinto mais elevado, equiparando-se à cerveja artesanal EME-IS (estilo Imperial Stout). A cerveja S-P (estilo Pilsner) não apresenta diferenças estatisticamente significativas com a cerveja artesanal M-P. Todavia, as cervejas industriais apresentam menor FPS dentro do seu estilo em comparação com as artesanais.

A composição da cerveja EL-MS em coco pode contribuir para o FPS da cerveja, dado que um extrato aquoso de coco apresentou um FPS igual a  $7,38 \pm 0,22$  (Malsawmtluangi et al., 2013). No artigo de P. Marques et al. (2017) extratos aquosos de alcachofra exibiram FPS igual a  $10,99 \pm 0,29$ , pelo que pode contribuir para o FPS da cerveja ALM-OS. Para além disso, o extrato aquoso de alcachofra reduziu em  $97,3 \pm 1\%$  os ROS despoletados pela exposição de células HaCaT a radiação UVB durante 15 min (P. Marques et al., 2017).

De acordo com a Regulamentação Europeia n.º 647/2006 de 22 de setembro apenas compostos com um FPS superior a 6 conferem proteção contra as radiações UV. Neste sentido, todas as cervejas apresentam potencial fotoprotetor.

Os valores de FPS das cervejas são significativamente inferiores ao controlo positivo (protetor solar comercial 50+) ( $p < 0,05$ ), o que seria expectável dado que este resulta de uma associação de filtros orgânicos garantindo proteção contra UVB e UVA. Exemplos de filtros orgânicos que garantem proteção contra UVB são o etilhexilsalicilato (derivado dos salicilatos com pico de absorção nos 306 nm) e etilhexiltriazona (derivado da triazina com pico de absorção nos 314 nm) (Nitulescu et al., 2023). Exemplos de filtros orgânicos que atestam proteção contra UVA são o butilmetoxidibenzoilmetano (avobenzona com pico de absorção nos 360 nm) e bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina/tinosorb S (derivado da triazina com

pico de absorção compreendido entre 310 – 345) (Nitulescu et al., 2023). Um exemplo de um filtro com largo espectro de absorção é o filtro drometriazol trisiloxano/ mexoryl XL (derivado do benzimidazol e benzotriazol) garante proteção contra UVB e UVA, apresentando picos de absorção em ambas as regiões nos comprimentos de onda 303 nm e 341 nm (Nitulescu et al., 2023).

Até onde se conhece, nenhum estudo se debruçou sobre a atividade fotoprotetora de extratos de cerveja. Kurzawa et al. (2022) estudaram o potencial fotoprotetor de extratos de lúpulo (aquoso, aquoso-glicólico e oleoso), tendo constatado que o FPS foi superior no extrato oleoso (21,05 na concentração 1,6 mg/mL), em comparação com o extrato aquoso (5,58 na concentração 0,8 mg/mL) e aquoso-glicólico (10,18 na concentração de 0,4 mg/mL). Assim sendo, pode-se constatar que a cerveja parece ter um maior potencial fotoprotetor do que o lúpulo (matéria-prima), pelo que a complexidade da matriz e o processo de fabrico podem ser variáveis relevantes no que concerne à fotoproteção.

#### **4.4.2. Capacidade de absorção no ultravioleta**

O ensaio da capacidade de absorção no UV permite determinar a capacidade fotoprotetora dos extratos na região UVB e UVA. Na tabela 9 encontram-se as capacidades de absorção no UV das cervejas, denotando-se diferenças significativas entre as amostras e o controlo positivo nos comprimentos de onda 300 e 350 nm ( $p < 0,05$ ). Tal encontra-se de acordo com o esperado, uma vez que o controlo positivo se trata de um protetor solar comercial com proteção UVA e UVB, pelo que a sua gama de proteção se encontra compreendida entre os 290 - 400 nm.

Tabela 9 – Capacidade de absorção no ultravioleta das cervejas em estudo.

$\lambda$ (nm)	CP	ALE						Lager				
		Milk Stout	Imperial Stout	Oatmeal Stout	India Pale Ale			Pilsner			Munich Dunkel	
		EL-MS	EME-IS	ALM-OS	EL-IPA	ALM-IPA	DC-IPA	EL-P	M-P	S-P <sup>#</sup>	S-MD <sup>#</sup>	B-MD
200	SD											
250	50,00 ± 0,26	55,60 ± 0,87 <sub>a</sub>	97,93 ± 0,64 <sub>*,b</sub>	<b>97,27 ± 1,47</b> <sub>*,b</sub>	73,27 ± 0,84 <sub>*,e</sub>	<b>131,90 ± 0,98</b> <sub>*,f</sub>	22,30 ± 0,20 <sub>*,g</sub>	81,70 ± 7,48 <sub>*,d</sub>	64,93 ± 1,19 <sub>*,h</sub>	49,50 ± 0,52 <sub>a,c</sub>	82,33 ± 2,83 <sub>*,d</sub>	47,37 ± 0,21 <sub>c</sub>
300	175,77 ± 1,37	38,13 ± 0,46 <sub>*,f</sub>	58,00 ± 0,40 <sub>*,a</sub>	<b>71,13 ± 0,23</b> <sub>*,b</sub>	34,50 ± 1,04 <sub>*,c</sub>	<b>73,73 ± 0,64</b> <sub>*,b</sub>	10,10 ± 0,10 <sub>*,g</sub>	31,67 ± 3,14 <sub>*,c,e</sub>	24,90 ± 1,40 <sub>*,d</sub>	23,27 ± 0,32 <sub>*,d</sub>	56,60 ± 0,72 <sub>*,a</sub>	31,97 ± 1,53 <sub>*,c,e</sub>
350	140,50 ± 1,15	17,13 ± 0,50 <sub>*,d</sub>	29,00 ± 0,20 <sub>*,e</sub>	<b>33,53 ± 0,50</b> <sub>*,f</sub>	11,43 ± 0,12 <sub>*,a</sub>	<b>26,87 ± 0,06</b> <sub>*,b</sub>	3,93 ± 0,06 <sub>*,g</sub>	13,35 ± 0,15 <sub>*,c</sub>	9,03 ± 0,25 <sub>*,h</sub>	7,17 ± 0,15 <sub>*,i</sub>	25,67 ± 1,17 <sub>*,b</sub>	12,17 ± 0,15 <sub>*,a,c</sub>
400	2,30 ± 0,17	8,73 ± 0,50 <sub>*,a</sub>	15,07 ± 0,12 <sub>*,d</sub>	<b>17,20 ± 0,35</b> <sub>*,e</sub>	2,63 ± 0,15 <sub>b</sub>	<b>9,33 ± 0,25</b> <sub>*,a</sub>	1,30 ± 0,00 <sub>*,c</sub>	3,15 ± 0,05 <sub>*,b</sub>	2,03 ± 0,12 <sub>b,c</sub>	1,10 ± 0,00 <sub>*,c</sub>	13,47 ± 0,70 <sub>*,f</sub>	4,87 ± 0,06 <sub>*,</sub>
450	0,23 ± 0,06	5,00 ± 0,40 <sub>*,a</sub>	9,07 ± 0,12 <sub>*,e</sub>	<b>10,53 ± 0,12</b> <sub>*,f</sub>	1,23 ± 0,15 <sub>*,b</sub>	<b>5,43 ± 0,32</b> <sub>*,a</sub>	0,87 ± 0,06 <sub>*,b,c</sub>	1,25 ± 0,05 <sub>*,b,c,d</sub>	0,75 ± 0,05 <sub>*,b,c,d</sub>	0,20 ± 0,00 <sub>a,d</sub>	8,00 ± 0,40 <sub>*,g</sub>	2,77 ± 0,06 <sub>*,h</sub>

<sup>#</sup>: Cerveja industrial.

SD: Sem Dados.

\*Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo positivo.

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas, para cada comprimento de onda ( $p < 0,05$ ).

Nos comprimentos de onda 300 nm e 350 nm as cervejas artesanais ALM-OS (estilo Oatmeal Stout) e ALM-IPA (estilo India Pale Ale) apresentam as maiores capacidades de absorção ( $p < 0,05$ ), o que é concordante com os resultados obtidos na determinação do FPS. A cerveja ALM-OS (estilo Oatmeal Stout) garante a maior capacidade de absorção nos 400 nm, todavia ALM-IPA (estilo India Pale Ale) é superada pelas cervejas EME-IS (estilo Imperial Stout) e S-MD (estilo Munich Dunkel).

De forma genérica, as cervejas DC-IPA (estilo India Pale Ale) e S-P (estilo Pilsner) apresentam a menor capacidade de absorção no UV, concordante com o FPS e com o TCF.

No estilo Stout, as cervejas ALM-OS (estilo Oatmeal Stout de origem portuguesa) e EME-IS (estilo Imperial Stout de origem espanhola) revelam-se mais vantajosas que a cerveja EL-MS (estilo Milk Stout de origem espanhola). No estilo IPA, a cerveja ALM-IPA (estilo India Pale Ale de origem portuguesa) destaca-se de forma positiva, seguindo-se a cerveja EL-IPA (espanhola) e, por fim, a cerveja DC-IPA (portuguesa), como a menos promissora. No estilo Pilsner, a cerveja EL-P (espanhola) supera as demais cervejas, sendo S-P (industrial), a que se apresenta menos promissora. No estilo Munich Dunkel a cerveja industrial supera a cerveja artesanal em todos os comprimentos de onda, embora a cerveja B-MD tenha apresentado maior TCF e FPS comparativamente à cerveja S-MD. Para além disso, sendo uma cerveja industrial e tendo em conta os resultados das determinações anteriores (TCF e ensaios antioxidantes) seria esperado que fosse menos promissora.

Até onde se sabe, nenhum estudo determinou a capacidade de absorção UV de cervejas, pelo que apenas é possível efetuar comparações com o controlo positivo, evidenciando a necessidade de novos estudos, a fim de se aumentar a robustez da informação.

Em termos metodológicos denotou-se a necessidade de proceder à diluição das cervejas do estilo Stout e Munich Dunkel atendendo à sua coloração. Priyanka et al. (2018) constatou que o aumento da concentração se traduz no aumento do FPS, pelo que o aumento do FPS pode advir da coloração do extrato e não da sua real capacidade fotoprotetora. O mesmo é expectável que aconteça para a capacidade de absorção.

Em suma, as cervejas com melhores perfis fotoprotetores devem ser estudadas quanto à possibilidade de desempenharem efeitos sinérgicos com os filtros solares comerciais, podendo ser capazes de potenciar o efeito fotoprotetor reduzindo a concentração de filtros sintéticos na composição da formulação, o que pode contribuir para a minimização das desvantagens associadas aos filtros sintéticos. Para além disso, a cerveja tem mostrado

potencial anti-inflamatório, pelo que o seu FPS pode aumentar *in vivo*, à semelhança da rutina (também presente na cerveja) que ao ser incorporada numa formulação com avobenzona e ácido aminobenzóico apresentou reduzido FPS *in vitro*, mas pelo seu potencial anti-inflamatório, o FPS aumentou *in vivo* (Negrão et al., 2012; Tomazelli et al., 2018). Adicionalmente, o extrato de cerveja liofilizada apresentou potencial ação anti-tirosinase ( $55,16 \pm 0,52$  mg de equivalente de ácido kógico/g), pelo que a cerveja não só apresenta potencial fotoprotetor como pode minimizar a hiperpigmentação decorrente da exposição à radiação UV (Scioli et al., 2022).

#### **4.5. Correlação entre os parâmetros físico-químicos, TCF, atividade antioxidante e fotoprotetora**

A correlação entre duas variáveis pode variar entre -1 a 1. Deste modo, as variáveis podem apresentar uma correlação positiva se os coeficientes variarem entre 0 e 1, uma correlação negativa se os coeficientes variarem entre -1 e 0 ou, podem mesmo não apresentar correlações se o coeficiente for 0 (Schober et al., 2018). Segundo Schober et al. (2018) coeficientes de correlação entre 0,90 – 1,00 indicam uma correlação muito forte entre as variáveis, coeficientes entre 0,70 – 0,89 indicam forte correlação, entre 0,40 – 0,69 indicam correlação moderada, entre 0,10 – 0,39 indicam fraca correlação e entre 0,00 – 0,10 a correlação é negligenciável. Posto isto, na tabela 10 encontram-se as correlações entre as diferentes variáveis em estudo.

Tabela 10 – Correlação entre os parâmetros físico-químicos, TCF, atividade antioxidante e fotoprotetora.

	Álcool	EBC	IBU	pH	Acidez	TAR	TCF	ABTS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FRAP	FPS
Álcool	-	-0,19	0,67	0,45	0,33	0,49	0,14	-0,07	-0,25	-0,15	0,37
EBC		-	-0,10	-0,78	0,56	0,70	0,02	0,21	0,08	0,36	0,25
IBU			-	-0,44	0,19	0,54	-0,51	0,27	-0,31	-0,12	0,45
pH				-	0,48	0,1	0,61*	-0,29	-0,12	-0,03	0,28
Acidez					-	0,73*	0,45	-0,29	-0,32	0,57	0,73*
TAR						-	0,35	-0,03	-0,14	0,48	0,84**
TCF							-	-0,11	0,06	0,46	0,57
ABTS								-	0,92****	-0,53	0,13
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>									-	-0,53	0,08
FRAP										-	0,50
FPS											-

EBC: *European Brewery Convention*; IBU: *International Bitterness Units*; TAR: Teor de Açúcares Redutores; TCF: Teor de Compostos Fenólicos; ABTS: Ensaio do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Ensaio do peróxido de hidrogénio; FRAP: Ensaio de determinação do poder antioxidante da redução do ião férrico; FPS: Fator de Proteção Solar.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

O teor em álcool apresenta fraca correlação com o TCF. Este resultado não vai de encontro a outros autores, uma vez que no estudo de S. Silva et al. (2022) o teor de álcool encontrava-se positivamente correlacionado com o TCF, bem como no estudo de Piazzon et al. (2010) em que a cerveja sem álcool apresentou menor teor de polifenóis quando comparada às demais. Adicionalmente, o teor em álcool apresenta correlações negativas com a atividade antioxidante. Porém, de acordo Tafulo et al. (2010) a atividade antioxidante correlaciona-se positivamente com o teor em álcool.

A cor da cerveja possui uma correlação negligenciável com o TCF, o que diverge com o obtido por S. Silva et al. (2022), onde as variáveis se correlacionaram positivamente, sendo significativas. Para além disso, a cor da cerveja apresenta uma forte correlação negativa com o pH, contrariamente ao descrito por S. Silva et al. (2022), cuja relação foi negligenciável. Em concordância com S. Silva et al. (2022), cervejas mais escuras estão associadas a um maior teor de acidez.

O amargor correlaciona-se moderadamente com o TAR (correlação positiva) e com o TCF (correlação negativa), em consonância com S. Silva et al. (2022). A correlação negativa entre o amargor e o TCF não seria espectável dado que, em teoria, os polifenóis contribuem para o amargor (Luo et al., 2020).

Por sua vez, o pH e o TCF estabelecem uma correlação positiva moderada e significativa. No entanto, no estudo de S. Silva et al. (2022) tal é negligenciável.

O teor de acidez apresenta forte correlação positiva e significativa com o TAR, similar a S. Silva et al. (2022) e com o FPS. Para além disso, apresenta correlação moderada com o FRAP. O TAR apresenta forte correlação positiva com o FPS ( $p < 0,05$ ).

O TCF estabelece uma correlação moderada com o FPS e com o FRAP. Contudo, a sua relação com atividade antioxidante determinada pelo ensaio ABTS e  $H_2O_2$  é negligenciável. A correlação com o FPS encontra-se de acordo com a literatura (Hashemi et al., 2019; Martínez-Inda et al., 2023). A fraca associação com a atividade antioxidante é corroborado pelo estudo de S. Silva et al. (2022). Todavia, nos estudos de Nardini & Garaguso (2020), Horn et al. (2021) e Nedyalkov et al. (2023) a atividade antioxidante está associada ao TCF.

O facto da cerveja constituir uma matriz de composição ampla, pode ser justificação para a falta de correlação entre o TCF e a atividade antioxidante (Madrau et al., 2010). Zhao et al. (2012) constataram que o potencial antioxidante da cerveja advém essencialmente da composição fenólica, no entanto a composição da cerveja em melanoidinas ( $1,64 \pm 0,01$  –

14,83 ± 0,09 g/L) e sulfitos (1,15 ± 0,02 – 37,32 ± 0,35 mg/L) podem apresentar as suas contribuições, apesar das correlações fracas e negligenciáveis, respetivamente, obtidas pelo autor. No estudo de Rivero et al. (2005) a composição de melanoidinas não se encontrava correlacionada com a atividade antioxidante, mas correlacionava-se com a proteção do DNA contra o dano oxidativo induzido pelo radical hidroxilo. No estudo de Madrau et al. (2010) os autores verificaram que durante o processo de secagem de ameixas o teor de polifenóis diminuiu. Porém, tal não se refletia na diminuição da capacidade antioxidante, podendo esta estar associada aos produtos da reação de *Maillard*, como as melanoidinas. Adicionalmente, no estudo de Nardini & Garaguso (2018) os sulfitos apresentaram contribuições positivas à capacidade antioxidante (FRAP e ABTS) de vinhos, pelo que a sua presença na cerveja, decorrente do processo fermentativo, pode apresentar a mesma ação. O teor de sulfitos diminuiu quando a cerveja foi sujeita a condições de envelhecimento natural e forçado, pelo que estes compostos podem ter sido utilizados para prolongar a vida da cerveja (Ferreira et al., 2023). Outros compostos como carotenoides, ácido ascórbico, iso- $\alpha$ -ácidos e interações sinérgicas podem contribuir para a atividade antioxidante da cerveja (Zhao et al., 2012).

A capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS correlaciona-se fortemente com a atividade antioxidante determinada pelo ensaio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambos os ensaios estabelecem uma correlação moderada no sentido negativo com o ensaio FRAP, o que atende ao esperado dadas as diferenças do mecanismo de ação.

#### **4.6. Atividade metabólica de células HaCaT inoculadas com extratos de cerveja**

A determinação da viabilidade celular visa quantificar o número de células viáveis, após a sua incubação com um composto ou a sua exposição a determinada condição, permitindo determinar a concentração ideal para o objetivo do ensaio (Riss et al., 2016). Deste modo, como se pretendia averiguar o efeito dos extratos de cerveja na pele, recorreu-se às células HaCaT (queratinócitos humanos), modelo amplamente utilizado em estudos *in vitro*.

O ensaio MTT é um dos ensaios passível de ser utilizado para a determinação de células viáveis, baseando-se na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem o reagente (MTT), originando os cristais de *formazano* de coloração roxa (insolúveis em água) (Ghasemi et al., 2021; Riss et al., 2016). Assim sendo, a quantidade de cristais e, conseqüentemente, a intensidade da coloração roxa estabelece proporcionalidade com o número de células metabolicamente ativas (Riss et al., 2016).

À semelhança dos ensaios anteriores, os extratos de cerveja foram solubilizados em água, apesar de no produto final a cerveja apresentar etanol na sua composição, (de quantidade variável, entre 4,10 – 8,0% (V/V). Tal facto deve-se à possibilidade de este influenciar a viabilidade celular, não sendo possível perceber se as alterações adviriam do extrato ou do solvente. Além disso, no estudo de Millucci et al. (2019) a inoculação de células de osteossarcoma primário (Saos-2) com etanol a 4,5% (V/V) resultou num aumento da viabilidade celular nas primeiras 24H de incubação, denotando-se a sua diminuição nas 48H e 72H seguintes, atingindo total citotoxicidade após 96H. No estudo de Ilieva et al., (2021) o etanol é considerado um dos solventes mais seguros para células HaCaT até à concentração testada (2% (V/V). Já no estudo de Guillén-Mancina et al., (2018) o etanol resultou em morte celular a partir da concentração de 40% (V/V) numa exposição de curta duração (2/3 segundos), verificando-se morte celular a partir da concentração 15% (V/V), numa exposição de curta duração (2/3 segundos) repetida (durante 5 min).

No anexo 1 encontram-se os resultados da atividade metabólica das células HaCaT incubadas com os extratos de cerveja durante 24H e 48H, sendo os resultados expressos em comparação ao controlo (meio de cultura). A incubação em dois tempos distintos reside na possibilidade de comparação dos efeitos dos extratos em estudo com diferentes tempos de contacto (24H e 48H), permitindo identificar as concentrações seguras, promotoras da viabilidade celular. Neste sentido, constituem extratos e concentrações de interesse os que promoverem a diferenciação celular ao longo do tempo (viabilidade celular superior 100%), ou

os capazes de manter a viabilidade celular (80–100%), protegendo as células dos próprios metabolitos celulares produzidos durante o tempo de incubação (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009). Deste modo, se a viabilidade celular for superior a 80% indica que o extrato não é tóxico, uma viabilidade entre 60–80% é indicativo que o extrato apresenta citotoxicidade fraca, entre 40 – 60% apresenta citotoxicidade moderada, evidenciando-se forte quando a viabilidade celular é inferior a 40% (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009).

De forma genérica, os extratos de cerveja em estudo na maioria das concentrações testadas não apresentaram citotoxicidade celular (viabilidade celular superior 80%), ou esta era fraca (viabilidade celular 60 – 80%) (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009) (Figura 13 e Anexo 1 – Figura 17, 18, 19 e 20). Para além disso, não se verificou uma relação nem uma linearidade entre a concentração e a viabilidade celular, o que pode advir da variabilidade dos extratos, incluindo da disponibilidade de compostos bioativos entre concentrações, despoletando, inevitavelmente, respostas celulares díspares.

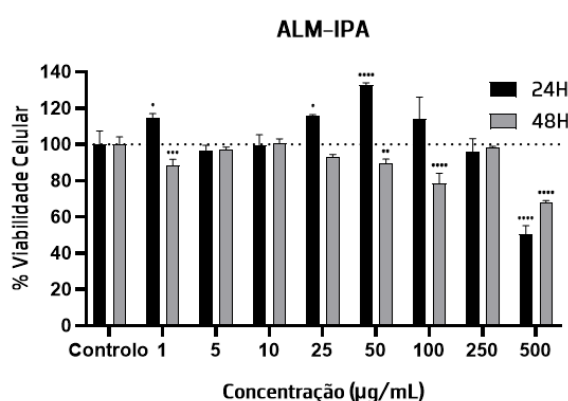


Figura 13 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com a cerveja ALM-IPA. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

O tempo de incubação de 48H resultou, na maioria dos casos, numa menor viabilidade celular comparativamente a 24H, o que pode dever-se a possível acumulação de produtos tóxicos do metabolismo celular, bem como à limitação dos nutrientes disponíveis ao longo do tempo (Abate et al., 2021).

A concentração de 500 µg/mL destacou-se por apresentar citotoxicidade moderada nas cervejas EL-MS, EME-IS, ALM-OS, DC-IPA, EL-P e S-MD durante a incubação de 48H.

Ressalva-se que na cerveja B-MD a mesma concentração no mesmo tempo de incubação apresentou forte citotoxicidade (viabilidade celular inferior a 30%). Durante a incubação de 24H, a concentração 500 µg/mL manifestou citotoxicidade moderada na cerveja ALM-IPA. Por outro lado, as cervejas S-P ( $p < 0,01$ ) e M-P ( $p < 0,0001$ ) apresentaram viabilidade celular superior ao controlo na concentração de 500 µg/mL, evidenciando-se um aumento da viabilidade celular face à concentração anterior, bem como ao período de incubação de 24H.

Além da concentração particularizada, a citotoxicidade moderada foi observada na cerveja ALM-OS na concentração 100 µg/mL após 48H de incubação e na cerveja B-MD na concentração 250 µg/mL, no mesmo tempo de incubação. Assim sendo, as concentrações identificadas com citotoxicidade moderada e forte não apresentam interesse tendo por base os objetivos do presente trabalho.

A inoculação de células HaCaT com as cervejas do estilo Stout, durante 24H (Anexo 1 – Figura 17), promoveu o aumento da viabilidade celular, em relação ao controlo, até à concentração 10 µg/mL, a partir da qual se denotou a sua diminuição, dependente da concentração. A cerveja ALM-OS (Figura 17c) destacou-se pelo aumento estatisticamente significativo da viabilidade celular, atingindo os  $134,51 \pm 3,37\%$  de viabilidade celular na concentração 10 µg/mL ( $p < 0,0001$ ). Todavia, na incubação de 48H a cerveja ALM-OS promoveu uma redução significativa da viabilidade celular ( $p < 0,0001$  para as concentrações 1, 5, 10, 100, 250 e 500 µg/mL;  $p < 0,01$  para a concentração 25 µg/mL e  $p < 0,001$  na concentração 50 µg/mL), não linear, comparativamente ao controlo. Deste modo, a cerveja ALM-OS revela-se citotóxica às 48H, apresentando um comportamento semelhante ao etanol no estudo de Millucci et al. (2019), onde após 24H de incubação a viabilidade celular diminuiu e, por isso, foi considerada desfavorável a formulações cosméticas. No caso das cervejas EL-MS (Figura 17a) e EME-IS (Figura 17b), a viabilidade celular manteve-se próxima dos 100% até à concentração 100 µg/mL, durante as 48H de incubação. Ressalva-se o aumento da viabilidade celular na incubação de 48H em comparação com a incubação de 24H nas concentrações 25 µg/mL (maior viabilidade celular em 48H,  $p < 0,05$ ) e 50 µg/mL na cerveja EL-MS e nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL (maior viabilidade celular em 48H,  $p < 0,01$ ), 50 µg/mL e 100 µg/mL na cerveja EME-IS.

No estilo IPA (Anexo 1 – Figura 18) não se verificou linearidade entre a concentração de extrato e a viabilidade celular. Na cerveja EL-IPA (Figura 18a) a viabilidade celular não apresentou diferenças significativas em relação ao controlo até à concentração 250 µg/mL

na incubação de 24H e até à concentração 50 µg/mL na incubação de 48H. A partir destas concentrações denotou-se a sua diminuição significativa. Na cerveja ALM-IPA (Figura 13) as concentrações 1 µg/mL ( $p < 0,05$ ), 25 µg/mL ( $p < 0,05$ ) e 50 µg/mL ( $p < 0,0001$ ) resultaram num aumento significativo da viabilidade celular na incubação de 24H, comparativamente ao controlo. Na incubação de 48H, a viabilidade celular manteve-se próxima do controlo nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL e 250 µg/mL constatando-se a sua diminuição nas demais concentrações. A concentração 25 µg/mL revela-se promissora por aumentar significativamente a viabilidade celular nas primeiras 24H, após as quais esta diminui para valores não diferentes do controlo. Na cerveja DC-IPA (Figura 18b) não foram observadas alterações significativas da viabilidade celular até à concentração 100 µg/mL na incubação de 24H. Na incubação de 48H, as concentrações 1 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL mantiveram a viabilidade celular próxima ao controlo, evidenciando-se um aumento significativo na concentração 100 µg/mL, constituindo a concentração promissora para a cerveja DC-IPA, uma vez que um contacto com o tempo de contacto prolongado (48H) resulta num aumento da viabilidade celular.

No estilo Pilsner (Anexo 1 – Figura 19), também não se verifica uma variação linear entre a viabilidade celular e concentração do extrato. Na cerveja EL-P (Figura 19a), a viabilidade celular nas concentrações 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 25 µg/mL nas primeiras 24H de incubação, aumentou significativamente ( $p < 0,0001$ ) em cerca de 50% em relação ao controlo. A incubação de 48H, apenas, reduz significativamente a viabilidade celular nas concentrações 10 µg/mL ( $p < 0,05$ ), 250 µg/mL ( $p < 0,01$ ) e 500 µg/mL ( $p < 0,0001$ ). Na cerveja M-P (Figura 19b), a viabilidade celular mantém-se próxima do controlo na maioria das concentrações, denotando-se uma redução significativa na concentração 250 µg/mL ( $p < 0,0001$ , 24H) e 500 µg/mL ( $p < 0,0001$ , 24H). Na concentração 500 µg/mL a viabilidade celular aumenta em 4 vezes comparativamente ao controlo, na incubação de 48H. Na cerveja S-P (Figura 19c), nas concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL a incubação de 48H revela-se mais promissora que a incubação de 24H, incluindo nas concentrações mais altas. Além disso, em nenhuma concentração se verificou uma diminuição significativa da viabilidade celular, sendo a única cerveja, apesar de industrial que apresentou viabilidade celular superior a 80% em todas as concentrações para ambos os tempos de incubação.

No estilo Munich Dunkel (Anexo 1 – Figura 20), denotou-se variação da viabilidade celular na maioria das concentrações. Na cerveja S-MD (Figura 20a), observou-se um aumento significativo da viabilidade celular ( $p < 0,0001$ ) nas concentrações 1 µg/mL (24H), 5 µg/mL (24H), 25 µg/mL (48H), 50 µg/mL (48H), 100 µg/mL (24H e 48H) e 250 µg/mL (24H). O aumento da viabilidade celular após 48H, comparativamente a 24H, nas concentrações 25 µg/mL e 50 µg/mL, revela-se promissor evidenciando uma promoção da diferenciação celular ao invés da sua diminuição, como se verificou nas demais concentrações. Na cerveja B-MD (Figura 20b) a viabilidade celular aumentou significativamente nas concentrações 1 µg/mL ( $p < 0,01$ ), 5 µg/mL ( $p < 0,0001$ ) e 100 µg/mL ( $p < 0,01$ ), em comparação com o controlo, na incubação de 24H. Todavia, nas mesmas concentrações verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular ( $p < 0,0001$  na concentração 1 µg/mL,  $p < 0,05$  na concentração 5 µg/mL e  $p < 0,0001$  na concentração de 100 µg/mL), após 48H. Já na concentração 25 µg/mL a viabilidade aumenta significativamente após 48H ( $p < 0,001$ ), pelo que esta concentração, neste tempo de contacto, não apresenta potencial citotóxico, revelando-se vantajosa.

Da análise de resultados, de forma abrangente, os extratos das cervejas em estudo permitem, não só, a manutenção da viabilidade celular, como promovem o seu aumento. Assim, podem contribuir para a reepitelização de tecidos danificados, contribuindo para a restauração da barreira cutânea, pela sua capacidade em mediar a resposta inflamatória e em proliferar (Piipponen et al., 2020).

Até onde se conhece nenhum estudo investigou o efeito de extratos de cerveja em células HaCaT. Todavia, no estudo de Merinas-Amo et al. (2016), extratos de cerveja lager industrial quando inoculados com fibroblastos de rato (NIH3T3) apresentaram-se citotóxicos na concentração 25 mg/mL ( $IC_{50}$ ) e, quando inoculados com células derivadas da leucemia humana (HL-60) na concentração 125 mg/mL, concentrações superiores às testadas. Os mesmo extratos foram testados em modelos *in vivo* (*Drosophila*) nas concentrações 3,125 – 50 mg/mL, verificando-se ausência de toxicidade (100% de sobrevivência), aumento da esperança média de vida e proteção contra danos pró-oxidativos induzidos por  $H_2O_2$ , dose dependente (Merinas-Amo et al., 2016).

Segundo os estudos de Tedesco et al. (2005) e Spagnuolo et al. (2014) o teor de polifenóis correlaciona-se negativamente com a viabilidade de células malignas (células de leucemia promielocítica humana – HL-60), desempenhando, a cerveja, uma ação apoptótica.

Tal atividade pode provir da sua composição em quercetina e resveratrol, caracterizados pela atividade anti-proliferativa (Tedesco et al., 2005). A ação antiproliferativa de extratos de cerveja sobre células cancerígenas é refutada pelo estudo de Alonso-Andrés et al. (2019), onde os extratos de cerveja escura, cerveja sem álcool e cerveja lager não induziram alterações significativas da viabilidade celular de células de astroglioma (células C6 de rato) e de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y), durante 24H de incubação.

Assim sendo, mais estudos são necessários a fim de se perceber se os extratos de cerveja desempenham ação citotóxica contra células cancerígenas, particularmente cutâneas. Tal, aumentaria o interesse sobre estes extratos dado que combinariam a ação antioxidante, fotoprotetora e proliferativa à atividade anticancerígena sobre células tumorais.

## **5. Incorporação de extratos de *Prunus avium* Lapins na cerveja artesanal**

A Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro estabelece as características, regras de produção e de comercialização de cerveja, adequando a legislação nacional às normas europeias. Desta forma, na elaboração da cerveja podem ser adicionados outros ingredientes destinados ao consumo humano, os quais devem obedecer à respetiva legislação específica ou, quando apropriado, autorizados em conformidade com a legislação relativa a novos alimentos, desde que esta adição não exceda 30% em volume do produto final (Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, 2022).

Neste sentido, procedeu-se à incorporação de extratos de CA e CE na cerveja ALM-IPA, cerveja artesanal que se revelou promissora tendo em conta os resultados do TCF ( $8,96 \pm 0,64$  mg de GAE/g), ensaios antioxidantes (valor de  $IC_{50} = 55,21 \pm 4,68$  µg/mL no ensaio ABTS, valor de  $IC_{50} = 23,54 \pm 1,53$  µg/mL no ensaio  $H_2O_2$  e valor de FRAP =  $53,74 \pm 1,27$  µmol de equivalentes de trolox /g), FPS ( $48,85 \pm 0,39$ ), capacidade de absorção e ensaios de viabilidade celular (ausência de citotoxicidade até à concentração 250 µg/mL após 24H e 48H de incubação).

### **5.1. Análise físico da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja**

Após a incorporação dos extratos CA e CE de cereja da variedade Lapins na cerveja ALM-IPA determinou-se o pH, teor de acidez e TAR, a fim de se perceber o impacto da incorporação destes extratos nos parâmetros químicos da cerveja.

Pela análise da figura 14, denota-se que a adição de CA, aparentemente, não proporcionou alterações de cor, já a adição do extrato etanólico parece diminuir a coloração da cerveja. O aumento do teor de antocianinas (flavonoide responsável pela pigmentação da cereja) na cerveja pela incorporação do extrato etanólico, pode constituir uma justificação para a alteração da cor da cerveja para avermelhado (Horincar et al., 2020).

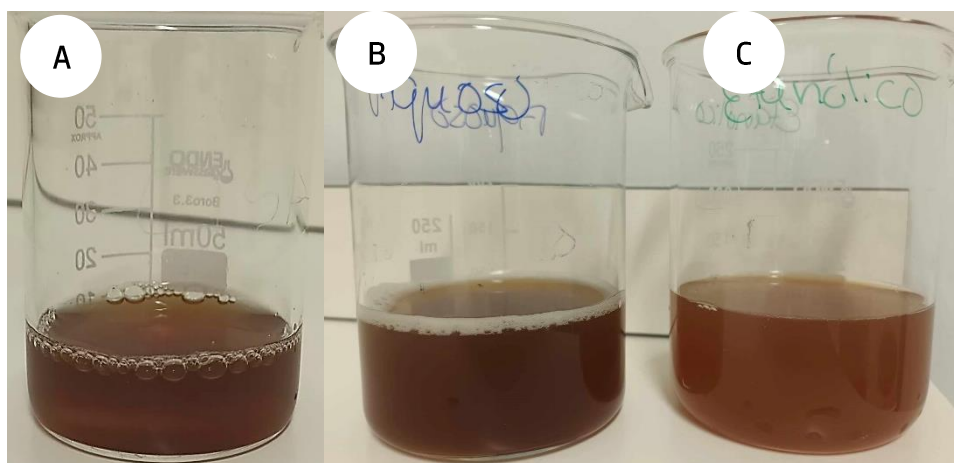


Figura 14 – Influência da adição de extratos de cereja Lapins na cerveja ALM-IPA na cor. A: ALM-IPA. B: ALMP-IPA+ CA. C: ALM-IPA + CE.

Pela análise da tabela 11, verificam-se alterações significativas entre os valores de pH determinados ( $p < 0,05$ ).

Tabela 11 – Análise química da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja.

Estilo	Código	% de álcool (V/V)	EBC (cor)	IBU (amargor)	pH	Teor de Acidez (%)	Teor de açúcares redutores (mg de glicose/ L)
India Pale Ale	ALM-IPA	6,50	23	55	$4,69 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,00^a$	$21088,33 \pm 143,80^a$
ALM-IPA após adição de extrato aquoso de cereja	ALM-IPA + CA	SD	SD	SD	$4,38 \pm 0,00^b$	$0,20 \pm 0,02^a$	$7313,33 \pm 289,76^b$
ALM-IPA após adição de extrato etanólico de cereja	ALM-IPA + CE	SD	SD	SD	$4,43 \pm 0,00^c$	$0,24 \pm 0,01^c$	$4046,67 \pm 97,09^c$

SD: Sem Dados. EBC: *European Brewery Convention*. IBU: *International Bitterness Units*. %: Percentagem. TAR: Teor de Açúcares Redutores

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Denota-se que a incorporação de extratos de cereja resulta numa diminuição significativa do pH de 4,69 para 4,38 na ALM-IPA + CA e 4,43 ALM-IPA + CE. A cerveja após adição do extrato aquoso apresentou o menor valor de pH. A adição dos extratos de cereja aproxima o pH daquilo que é o considerado ideal pela indústria cervejeira (3,90–4,60), mantendo-se no intervalo ideal para cervejas do tipo Ale (3–6) (Anderson et al., 2019; Eßlinger, 2009; Pai et al., 2015).

Apesar do pH da cereja em estudo não ter sido determinado laboratorialmente é expectável que estas apresentem características ácidas, dado que o pH de cerejas Lapins foi igual a 3,92 e a  $3,63 \pm 0,006$  nos estudos de Pilli et al. (2019) e A. C. Gonçalves et al. (2020), respetivamente. Tais valores são corroborados pelo estudo de Hayaloglu & Demir (2015) onde o pH de 12 outras espécies de cereja variou entre 3,60–3,80. Assim sendo, a redução do pH da cerveja ALM-IPA pode advir das características ácidas da cereja.

O teor de acidez aumentou após a adição do extrato CA e CE ( $p < 0,05$ ). O aumento da acidez após a adição de extratos de cereja pode advir do reduzido pH da cereja e da sua composição em ácidos orgânicos, como: ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido acético (Hayaloglu & Demir, 2015). No estudo de Hayaloglu & Demir (2015) a acidez da cereja variou entre 0,71 – 1,01 g de equivalente de ácido málico/100g de cereja fresca.

O TAR diminuiu significativamente na cerveja ALM-IPA após a adição de extratos de cereja ( $p < 0,05$ ), sendo ALM-IPA + CE a cerveja com menor TAR. Tal não seria o expectável, uma vez que nos estudos de Hayaloglu & Demir (2015) e Cao et al. (2015) foi detetada a presença de glicose, frutose, sacarose e xilose na cereja, sendo expectável o aumento destes compostos na cerveja. Tendo em conta que os açúcares redutores são utilizados pela levedura para síntese de álcool e CO<sub>2</sub>.

A influência da adição de compostos nos parâmetros químicos da cerveja não é clara. No estudo de Nardini & Garaguso (2020) cervejas de fruta (cerejas, framboesas, pêssegos, damasco, uvas, ameixas, casca de laranja e maçãs) apresentaram menor pH e maior teor alcoólico comparativamente às cervejas convencionais. No artigo de Ritter et al. (2016), a adição de frutos ácidos (pêssegos com pH = 3,75 e mirtilos com pH = 3,05) resultou numa diminuição do pH da cerveja de fruta em comparação com o controlo (cerveja artesanal), já a adição de banana, menos ácida, (pH = 5,13) resultou num aumento do pH face ao controlo. A adição manga (*Mangifera indica*) induziu uma diminuição do pH e um aumento do teor

alcoólico, comparativamente ao controlo (cerveja Pilsner) (Gasinski et al., 2020). No estudo de Shopska et al. (2023) e Nedyalkov et al. (2023), a adição de sumo e bagaço de cereja (*Prunus avium*) durante o processo fermentativo de cerveja (dia 1 e 7 da fermentação) resultou num aumento do teor alcoólico comparativamente ao controlo (cerveja Pilsner) ( $p < 0,05$ ), não se traduzindo em diferenças significativas entre os diferentes extratos e momentos de incorporação. Por outro lado, a adição de extratos secos como casca de laranja, extratos etanólicos de beringela e de folhas desidratadas de alcachofra não provocaram alterações no pH nem no teor alcoólico (Horincar et al., 2020; Ritter et al., 2016; Santa et al., 2020). Posto isto, a adição de frutas *in natura* parece ter impacto nas características químicas da cerveja, já a adição de extratos secos não. No entanto, no presente trabalho procedeu-se à adição de extrato liofilizado de cereja e constataram-se alterações de pH.

A adição de extratos à cerveja pode provocar alterações no teor de álcoois superiores, ésteres (notas frutais e florais), aldeídos (confere aroma verde e sabor rançoso à cerveja) e diacetonas vicinais (em valores exacerbados confere sabor desagradável) cujas determinações são essenciais dada a sua influência no sabor, aroma e estabilidade da cerveja (EBlinger, 2009; Shopska et al., 2023).

Os parâmetros físico-químicos das cerejas estão dependentes do clima, solo, nível de maturação, altura de colheita, condições de armazenamento e transporte (Hayaloglu & Demir, 2015; Kent et al., 2018). Deste modo, frutas pertencentes à mesma variedade, mesmo que possam ter sido colhidas na mesma região, estão sujeitas a diferenças intrínsecas, que podem condicionar a sua composição fitoquímica e nutricional (Cunha et al., 2023).

## 5.2. TCF da cerveja ALM-IPA após incorporação dos extratos de cereja

A incorporação de extratos de cereja na cerveja ALM-IPA resultou em alterações significativas no TCF ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12). Apesar do extrato CA apresentar menor TCF (3,59 mg de GAE/g) comparativamente ao extrato CE (5,25 mg de GAE/g), a incorporação de extrato CA resultou num aumento significativo do TCF da cerveja ALM-IPA (TCF aumentou de  $8,96 \pm 0,64$  mg de GAE/g para  $15,10 \pm 0,16$  mg de GAE/g) ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a incorporação do extrato CE resultou numa diminuição significativa do TCF (TCF diminuiu de  $8,96 \pm 0,64$  mg de GAE/g para  $2,48 \pm 0,24$  mg de GAE/g) ( $p < 0,05$ ), contrariamente ao esperado, dado o extrato de CE apresentar maior TCF.

Tabela 12 - Teor de compostos fenólicos totais (TCF) da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins (aquoso e etanólico).

Estilo	Código	TCF (mg de equivalentes de GAE/g)
India Pale Ale	ALM-IPA	$8,96 \pm 0,64^a$
Extrato aquoso de cereja	CA	$3,59 \pm 0,08^b$
Extrato etanólico de cereja	CE	$5,25 \pm 0,27^c$
ALM-IPA após adição de extrato aquoso de cereja	ALM-IPA + CA	$15,10 \pm 0,16^d$
ALM-IPA após adição de extrato etanólico de cereja	ALM-IPA + CE	$2,48 \pm 0,24^e$

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O TCF de CE supera o relatado na literatura para cerejas Lapins, onde o extrato etanólico de cereja apresentou TCF igual a  $2,1 \pm 0,3$  mg de GAE/g de extrato seco e  $1,73 \pm 0,90$  mg de GAE/g extrato fresco nos artigos de Clodoveo et al. (2023) e Hu et al. (2021), respetivamente. No estudo de Hayaloglu & Demir (2015), o TCF de extratos metanólicos de 12 outras variedades de cereja variou  $0,58 \pm 0,11$  mg de GAE /g e  $1,15 \pm 0,08$  mg de GAE /g de cereja fresca, ao contrário do obtido no estudo de Bastos et al. (2015), cujo TCF de extrato metanólico de cereja foi igual a  $5,58 \pm 0,009$  mg/g de extrato. Constatou-se, então, que os extratos secos, concentrados, apresentam maior TCF que os extratos frescos (Kent et al., 2018).

Apesar dos estudos encontrados apenas avaliarem o TCF de extratos alcoólicos de cereja, é esperado que o extrato CA apresente menor TCF que CE, dado que a presença de

álcool encontra-se associada à maior capacidade extrativa de compostos fenólicos (Nedyalkov et al., 2023).

No estudo de Nedyalkov et al. (2023), a incorporação de sumo e bagaço de cereja no processo fermentativo da cerveja proporcionou um aumento do TCF, ácidos fenólicos e flavonoides, sendo superior na adição de bagaço de cereja no dia 7 da fermentação.

No estudo de Nardini & Garaguso (2020) a adição de cerejas à cerveja apresentou maior teor de polifenóis ( $747 \pm 8$  mg de GAE/L e  $767 \pm 13$  mg de GAE/L) e flavonoides ( $196,4 \pm 1,9$  mg de equivalente de catequinas /L e  $221,8 \pm 3,3$  mg de equivalente de catequinas /L), quando comparado a outras frutas como laranja, uva, framboesas, pêssegos, damasco, uvas, ameixas, casca de laranja, maçãs (polifenóis variaram entre  $399 \pm 11$  mg de GAE/L e  $639 \pm 4$  mg de GAE/L; flavonoides variaram entre  $67,9 \pm 0,4$  mg de equivalente de catequinas/L e  $148,9 \pm 2,0$  mg de equivalente de catequinas/L) e às cervejas convencionais (polifenóis variaram entre  $321 \pm 9$  mg de GAE/L e  $486 \pm 10$  mg de GAE/L; flavonoides variaram entre  $51,9 \pm 1,1$  mg de equivalente de catequinas/L e  $73,2 \pm 0,6$  mg de equivalente de catequinas/L).

### **5.3. Atividade antioxidante da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja**

No ensaio ABTS a cerveja ALM-IPA classifica-se como tendo atividade antioxidante moderada ( $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) (Kuetze & Efferth, 2010). Apesar da incorporação de extratos de cereja se traduzir em diferenças e significativas ( $p < 0,05$ ), a cerveja mantém a mesma classificação após a incorporação de CA. Já na incorporação do extrato CE, a atividade antioxidante da cerveja diminui significativamente ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Kuetze & Efferth, 2010). Tais resultados não eram os expectáveis dado que o extrato CA apresentou maior valor de  $IC_{50}$  pelo que seria esperado que após incorporação na cerveja ALM-IPA resultasse em maior valor de  $IC_{50}$ .

Ambos os extratos de cereja apresentam baixa atividade antioxidante segundo, Kuetze & Efferth (2010), sendo CE o que apresenta menor valor de  $IC_{50}$ , concordante com o maior TCF.

No estudo de Hu et al. (2021), o extrato etanólico (70% V/V) de cereja Lapins apresentou capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS igual a  $0,37 \pm 0,01$  mg de equivalente de ácido ascórbico/g de extrato fresco. No estudo de Clodoveo et al. (2023) para extrato da polpa de cerejas Lapins foi igual a  $2,6 \pm 0,4$  mg de trolox/g de extrato seco. No estudo de Y. Liu et al. (2011) foi igual a  $294,77 \pm 13,58$  mM trolox/100g de extrato fresco (metanólico). No estudo de Hayaloglu & Demir (2015) variou entre  $4,49 \pm 0,04$  mg de trolox/g de extrato fresco e  $6,15 \pm 0,04$  mg de trolox/g de extrato fresco, para 12 variedades, não incluindo a Lapins.

No ensaio  $H_2O_2$  a cerveja ALM-IPA apresentou uma atividade antioxidante significativa, porém vê aumentado o valor de  $IC_{50}$  aquando da incorporação de extratos de cereja (Kuetze & Efferth, 2010). Na incorporação de CE as cervejas mantêm a capacidade antioxidante elevada, apesar do aumento do valor de  $IC_{50}$ . Todavia, a incorporação de CA revela-se menos promissora, pelo que a cerveja ALM-IPA + CA passa a apresentar atividade antioxidante moderada (Kuetze & Efferth, 2010). Nesta situação, tendo o extrato CE o menor valor de  $IC_{50}$ , os resultados após incorporação encontram-se de acordo com o esperado, sendo concordantes com o TCF.

O extrato CA apresenta baixa atividade antioxidante ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) e o extrato CE apresenta atividade moderada ( $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) (Kuetze & Efferth, 2010).

Relativamente ao ensaio da ferrozina, não foi possível determinar o  $IC_{50}$  na cerveja com extrato de cereja incorporado. Neste sentido, para a capacidade de quelação de iões  $Fe^{2+}$ , os extratos ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE apresentam atividade antioxidante baixa (Kuetze &

Efferth, 2010). Similarmente, os extratos CA e CE apresentam IC<sub>50</sub> superior a 1 mg/mL, exibindo baixa atividade antioxidante, tendo por base o ensaio da ferrozina (Kuefe & Efferth, 2010).

No ensaio FRAP, a cerveja ALM-IPA vê diminuído o seu poder redutor com a adição de extratos de cereja, constatando-se o menor valor com a adição de CE, o que não era previsível dado que o extrato CA é que apresenta menor poder redutor do ferro. Os valores de FRAP para os extratos de cereja encontram-se em conformidade com o TCF dos mesmos.

No estudo de Hu et al. (2021) o poder redutor de cerejas Lapins (etanol 70% V/V) foi igual a  $0,95 \pm 0,07$  mg de equivalente de ácido ascórbico/g. No estudo de Cao et al. (2015) o poder redutor do ferro foi igual a  $249,32 \pm 8,01$  e  $182,03 \pm 7,90$  mg de equivalentes de trolox/100g de extrato fresco de cerejas (metanólico) para Santana e Black Pearl, respetivamente. No estudo de Hayaloglu & Demir (2015) variou entre  $0,44 \pm 0,08$  mg de trolox /g e  $1,61 \pm 0,12$  mg de trolox /g de cereja fresca em 12 variedades de cereja. No estudo de Bastos et al. (2015) a concentração de extrato de cereja (80% V/V de metanol e 20% V/V de água) capaz de reduzir 50% de Fe<sup>3+</sup> foi 0,57 mg/mL.

É de ressaltar a escassez de estudos que analisem a atividade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de cereja, o que impossibilitou a comparação com os resultados obtidos.

Por fim, a adição de extratos de cereja na cerveja ALM-IPA não se revelou promissora, pois denota-se a diminuição do TCF e da atividade antioxidante (Tabela 13).

Tabela 13 – Atividade antioxidante da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins, segundo os ensaios de ABTS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferrozina e FRAP.

Estilo	Código	ABTS (IC <sub>50</sub> µg/mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> µg/mL)	Ferrozina	FRAP (µmol de equivalentes de trolox/g)
India Pale Ale	ALM-IPA	55,21 ± 4,68 <sup>a</sup>	23,54 ± 1,53 <sup>a</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	53,74 ± 1,27 <sup>a</sup>
Extrato aquoso de cereja	CA	196,98 ± 5,38 <sup>b</sup>	142,42 ± 3,61 <sup>b</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	23,38 ± 1,30 <sup>b</sup>
Extrato etanólico de cereja	CE	116,54 ± 3,60 <sup>c</sup>	72,66 ± 1,92 <sup>c</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	33,25 ± 0,54 <sup>c</sup>
ALM-IPA após adição de extrato aquoso de cereja	ALM-IPA + CA	86,16 ± 5,33 <sup>d</sup>	65,08 ± 1,69 <sup>d</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	27,58 ± 0,42 <sup>d</sup>
ALM-IPA após adição de extrato etanólico de cereja	ALM-IPA + CE	178,13 ± 5,84 <sup>e</sup>	43,27 ± 2,14 <sup>e</sup>	Sem IC <sub>50</sub>	20,36 ± 0,70 <sup>e</sup>

ABTS: Ensaio do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Ensaio do peróxido de hidrogénio; FRAP: Ensaio de determinação do poder antioxidante da redução do ião férrico. As diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tal não seria o esperado, pois no estudo de Nedyalkov et al. (2023) verificou-se um aumento da capacidade antioxidante da cerveja, nos ensaios ABTS e FRAP, após incorporação de sumo e bagaço de cereja durante o processo fermentativo, comparativamente à cerveja controlo (cerveja Pilsner). No estudo de Nardini & Garaguso (2020), a adição de cerejas à cerveja durante o seu processo de fabrico, apresentou maior atividade antioxidante para os ensaios FRAP (8,55 ± 0,04 mM de equivalentes de sulfato ferro e 9,76 ± 0,11 mM de equivalentes de sulfato ferro) e ABTS (3,41 ± 0,10 mM de equivalentes em trolox e 3,53 ± 0,06 mM de equivalentes em trolox), quando comparado a outras frutas como laranja, uva, framboesas, pêssegos, damasco, uvas, ameixas, casca de laranja, maçãs (valores do ensaio FRAP variaram entre 3,08 ± 0,07 mM de equivalente de sulfato ferroso e 6,85 ± 0,18 mM de equivalente de sulfato ferroso; valores do ensaio ABTS variaram entre 1,62 ± 0,02 mM de equivalentes de trolox e 2,81 ± 0,01 mM de equivalentes de trolox) e às cervejas convencionais (valores do ensaio FRAP variaram entre 2,80 ± 0,04 mM de equivalente de sulfato ferroso e 4,39 ± 0,18 mM de equivalente de sulfato ferroso; valores do ensaio ABTS variaram entre 1,29 ± 0,02 mM de equivalentes de trolox e 2,03 ± 0,04 mM de equivalentes de trolox).

## 5.4. Atividade fotoprotetora da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja

### 5.4.1. FPS

Após incorporação dos extratos de cereja, o FPS da cerveja ALM-IPA reduziu significativamente (Tabela 14).

Tabela 14 – Fator de proteção solar da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins (aquoso e etanólico).

Estilo	Código	FPS
Controlo Positivo	CP	134,21 ± 0,45
India Pale Ale	ALM-IPA	48,85 ± 0,39 <sup>*,a</sup>
Extrato aquoso de cereja	CA	10,57 ± 0,08 <sup>*,b</sup>
Extrato etanólico de cereja	CE	17,14 ± 0,49 <sup>*,c</sup>
ALM-IPA após adição de extrato aquoso de cereja	ALM-IPA + CA	20,56 ± 0,08 <sup>*,d</sup>
ALM-IPA após adição de extrato etanólico de cereja	ALM-IPA + CE	20,98 ± 0,54 <sup>*,d</sup>

\* Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo positivo. As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Apesar das diferenças significativas entre os extratos CA e CE ( $p < 0,05$ ), ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE não apresentam diferenças significativas entre si. Ainda que menor, o FPS de ALM-IPA após incorporação dos extratos de cereja é superior a 6, pelo que, segundo a Regulamentação Europeia n.º 647/2006 de 22 de setembro, os extratos conferem proteção contra as radiações UV.

Os extratos de CA e CE exibem FPS superior a 6, pelo que são capazes de proteger contra as radiações UV (Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, 2006), sendo CE o que se mostra mais promissor, sendo este resultado concordante com o de TCF.

Dada a associação de filtros UVA e UVB seria esperado que mesmo após adição dos extratos à cerveja ALM-IPA que o FPS fosse inferior ao controlo positivo, o que veio a verificar.

#### 5.4.2. Capacidade de absorção no ultravioleta

A adição de extratos de cereja à cerveja ALM-IPA reduziu significativamente a capacidade de absorção da cerveja em todos os comprimentos de onda ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15).

Tabela 15 – Capacidade de absorção no ultravioleta da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja Lapins.

$\lambda$ (nm)	CP	India Pale Ale	Extrato aquoso de cereja	Extrato etanólico de cereja	ALM-IPA após adição de extrato aquoso de cereja	ALM-IPA após adição de extrato etanólico de cereja
		ALM-IPA	CA	CE	ALM-IPA + CA	ALM-IPA + CE
200	SD					
250	50,00 ± 0,26	131,90 ± 0,98 <sup>a</sup>	22,00 ± 0,10 <sup>b</sup>	40,13 ± 1,36 <sup>c</sup>	60,33 ± 0,21 <sup>d</sup>	62,73 ± 1,55 <sup>d</sup>
300	175,77 ± 1,37	73,73 ± 0,64 <sup>a</sup>	15,77 ± 0,12 <sup>b</sup>	25,17 ± 0,71 <sup>c</sup>	30,57 ± 0,25 <sup>d</sup>	31,37 ± 0,81 <sup>d</sup>
350	140,50 ± 1,15	26,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,60 ± 0,17 <sup>b</sup>	13,43 ± 0,38 <sup>c</sup>	11,27 ± 0,25 <sup>d</sup>	11,93 ± 0,42 <sup>d</sup>
400	2,30 ± 0,17	9,33 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,21 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,32 <sup>c</sup>	3,73 ± 0,25 <sup>b</sup>	4,47 ± 0,21 <sup>d</sup>
450	0,23 ± 0,06	5,43 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,17 <sup>b</sup>	4,43 ± 0,21 <sup>c</sup>	2,20 ± 0,20 <sup>b,d</sup>	2,73 ± 0,23 <sup>b,d</sup>

SD: Sem Dados.

<sup>a</sup> Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparativamente ao controlo positivo.

As diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas, para cada comprimento de onda ( $p < 0,05$ ).

A capacidade de absorção de ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE é similar, diferindo significativamente no comprimento de onda 400 nm ( $p < 0,05$ ). As combinações ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE apresentam capacidade de absorção superior ao CP nos comprimentos de onda 250, 400 e 450 nm, concordante com o esperado, dado que os comprimentos de ondas mencionados se encontram fora da gama de proteção do protetor solar (290 – 400 nm).

Os extratos de cereja apenas superam o CP nos comprimentos de onda 400 e 450 nm, fora da gama de proteção do protetor solar utilizado. O extrato CE revela-se mais promissor, comparativamente ao extrato CA, indo de encontro ao TCF.

Até onde se sabe, nenhum estudo avaliou a capacidade fotoprotetora de extratos de cereja, impedindo a comparação. Não obstante, Oprüş et al. (2021) estudaram a capacidade fotoprotetora de abrunho (*Prunus spinosa*), pertencente à família de *Prunus avium*, verificando que o extrato concentrado de abrunho possui FPS igual a  $8,84 \pm 0,044$ , sendo este influenciado pelo tipo de extrato (tempo, temperatura e solvente). Os extratos CA e CE exibem

FPS superiores. Para além disso, aquando da incorporação de abrunho numa formulação cutânea com ação fotoprotetora, esta apresentou estabilidade quando sujeita a estudos de estabilidade, preservando a atividade fotoprotetora (Opriş et al., 2021).

## 5.5. Atividade metabólica de células HaCaT após incorporação de extratos de *Prunus avium* Lapins

Na figura 15 encontram-se os resultados relativos à atividade metabólica das células HaCaT quando inoculadas com a cerveja ALM-IPA e após a sua combinação com extratos de cereja, durante 24H e 48H de incubação.

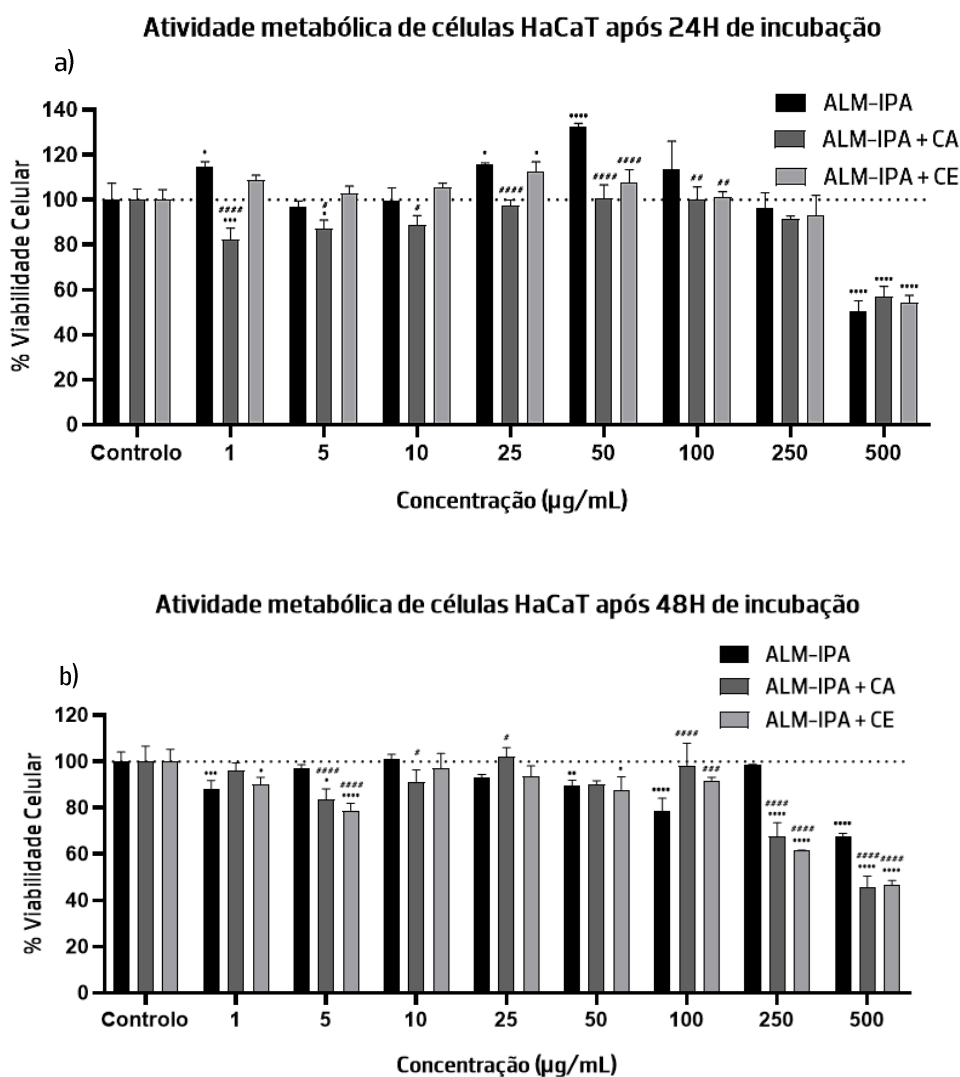


Figura 15 – Comparação da viabilidade celular de células HaCaT após incubação com a cerveja ALM-IPA e após incorporação de extrato aquoso de *Prunus avium* Lapins (ALM-IPA + CA) e extrato etanólico de *Prunus avium* Lapins (ALM-IPA + CE), após a) 24H e b) 48H de incubação. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As diferenças entre a cerveja ALM-IPA e ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE são representadas por # (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$ ).

De forma genérica, a viabilidade celular é superior 80%, o que revela que os extratos não apresentam citotoxicidade, à exceção da concentração 500 µg/mL, que se mostrou modernamente tóxica para os três extratos, durante 24H e 48H de incubação. Adicionalmente, no período de incubação de 48H, na concentração 100 µg/mL na cerveja ALM-IPA a viabilidade celular rondou os 78% e na concentração 250 µg/mL rondou os 67% para ALM-IPA + CA e 61% para ALM-IPA + CE, o que é indicativo de citotoxicidade fraca (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009). Neste sentido, os extratos apresentaram ausência de citotoxicidade até à concentração 250 µg/mL na incubação de 24H e, até à concentração 50 µg/mL na incubação de 48H.

No período de incubação igual a 24H (Figura 15a) a incorporação de extratos de cereja provocou, de forma genérica, uma diminuição da viabilidade celular comparativamente à cerveja ALM-IPA, à exceção das concentrações 5 µg/mL e 10 µg/mL, onde ALM-IPA + CE apresentou maior viabilidade celular comparativamente a ALM-IPA. Para além disso, nas concentrações 1 µg/mL e 25 µg/mL, ALM-IPA + CE apresentou menor viabilidade celular que a cerveja ALM-IPA. Todavia, as diferenças não foram consideradas significativas. Neste sentido, a incorporação de extrato etanólico de cereja parece mais promissora comparativamente à adição do extrato aquoso, o qual exibiu uma diminuição significativa da viabilidade celular comparativamente a ALM-IPA para todas as concentrações à exceção das concentrações 250 µg/mL e 500 µg/mL. Na concentração 250 µg/mL os extratos apresentaram percentagens de viabilidade celular próximas do controlo negativo, e os extratos ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE não diferiram significativamente de ALM-IPA.

No período de incubação igual a 48H (Figura 15b), nas concentrações 5 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL verificou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular após incorporação dos extratos de cereja na cerveja ALM-IPA, comparativamente à própria. Na concentração 100 µg/mL denotou-se um aumento da viabilidade celular dos extratos ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE em relação à cerveja isolada ALM-IPA, que apresentava uma viabilidade celular significativamente inferior ao controlo negativo (meio) ( $p < 0,0001$ ). Na concentração 25 µg/mL, também, se verificou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular de ALM-IPA + CE face a ALM-IPA. Nas concentrações 1 µg/mL e 50 µg/mL não se verificaram diferenças significativas de ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE comparativamente a ALM-IPA.

Assim, a incorporação de extrato etanólico por 24H revelou-se promissora nas concentrações 5 µg/mL e 10 µg/mL (sem diferenças significativas). No entanto, após 48H denotou-se uma diminuição significativa da viabilidade celular na concentração 5 µg/mL ( $p < 0,0001$ ). Na concentração 10 µg/mL observou-se um comportamento similar do extrato após 48H de incubação. No caso da incorporação do extrato aquoso de cereja, este proporcionou um aumento da viabilidade celular após 48H nas concentrações 25 µg/mL e 100 µg/mL, apesar de apresentar menor viabilidade que ALM-IPA na incubação de 24H, a viabilidade da mesma é próxima do controlo negativo.

No anexo I – figura 21 encontram-se os efeitos dos extratos aquoso (Figura 21a) e etanólico (Figura 21b) de cereja na viabilidade celular de células HaCaT.

O extrato aquoso até à concentração 100 µg/mL não induziu alterações significativas da viabilidade celular face ao controlo, durante 24H e 48H de incubação. Na concentração 250 µg/mL a viabilidade celular para ambos os tempos de incubação é significativamente inferior ao controlo negativo ( $p < 0,001$  para 24H e  $p < 0,01$  para 48H). No entanto, esta é superior a 80%, pelo que até à concentração mencionada os extratos não apresentaram citotoxicidade (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009). O extrato aquoso, na concentração 500 µg/mL na incubação de 24H, apresentou citotoxicidade baixa (viabilidade celular entre 60-80%). Todavia, após 48H de incubação mostrou-se moderadamente tóxico (viabilidade celular entre 40-60%) (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009).

O extrato etanólico de cereja não apresentou citotoxicidade (viabilidade celular superior a 80%) até à concentração 250 µg/mL para ambos os tempos de incubação (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009). No tempo de incubação de 24H, verificou-se um aumento significativo da viabilidade celular nas concentrações 1 µg/mL ( $p < 0,01$ ), 25 µg/mL ( $p < 0,01$ ) e 50 µg/mL ( $p < 0,001$ ) face ao controlo negativo (meio). Por outro lado, no período de incubação de 48H, apenas se verificou um aumento significativo da viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL ( $p < 0,0001$ ), potencialmente vantajoso numa utilização de longo prazo. A maior concentração (500 µg/mL) revelou citotoxicidade fraca (viabilidade celular entre 60-80%) para os dois tempos de incubação (ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices, 2009).

Ao contrário dos estudos de Letsiou et al. (2021) e Letsiou et al. (2022), onde a viabilidade de fibroblastos dérmicos humanos (células NHDF) e dos queratinócitos humanos

normais primários (células NHEK) diminuiu com o aumento da concentração de extrato metanólico de cereja, no presente estudo tal não ocorre de forma linear. A concentração 1 µg/mL é comum entre os estudos e o presente trabalho, sendo concordante a ausência de citotoxicidade (Letsiou et al., 2021, 2022).

O aumento da viabilidade celular face ao controlo induzido pelo extrato etanólico pode advir de dados que apontam para o facto de o extrato regular positivamente genes como o *vegf*, o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e a inibina  $\beta$ -A (INHBA) associados ao processo de proliferação celular (Letsiou et al., 2021, 2022). Para além disso, o extrato pode, ainda, regular positivamente os genes *pxn* (associado à adesão celular) e *cav1* promovendo a diferenciação de queratinócitos (Letsiou et al., 2022).

## **5.6. Capacidade protetora da cerveja ALM-IPA após incorporação de extratos de cereja em células HaCaT**

A determinação da capacidade protetora dos extratos no que concerne ao ensaio de pré-incubação com o reagente *t*-BOOH, visa perceber se os extratos conferem vantagens adaptativa às células HaCaT, permitindo que estas sejam capazes de resistir ao stress oxidativo induzido pelo reagente (Wenz et al., 2018). O *t*-BOOH é um reagente muito utilizado como indutor do stress oxidativo em ensaios *in vitro* (Wenz et al., 2018). O seu mecanismo é pouco claro. Sendo a ferroptose apontada como forma do reagente induzir os danos celulares, demarcada pela peroxidação lipídica, inibição das defesas antioxidantes e danos no DNA (Wenz et al., 2018).

No ensaio de pré-incubação utilizou-se a quercetina como controlo positivo, uma vez que esta diminuiu a citotoxicidade induzida pelo *t*-BOOH e a geração de ROS ( $p < 0,01$ ) em células da glia C6 (Gitika et al., 2006).

Na figura 16 encontram-se os resultados relativos ao ensaio de pré-incubação, sendo possível constatar que o extrato de cerveja isolado, ALM-IPA, não conferiu capacidade de proteção das células HaCaT contra tóxico, uma vez que a viabilidade celular apresentou-se estatisticamente inferior ( $p < 0,0001$ ) ao controlo positivo (quercetina a 50 µg/mL) em todas as concentrações testadas. É de salientar que as percentagens de viabilidade celular se mantiveram próximas ou inferiores às células exclusivamente inoculadas com *t*-BOOH.

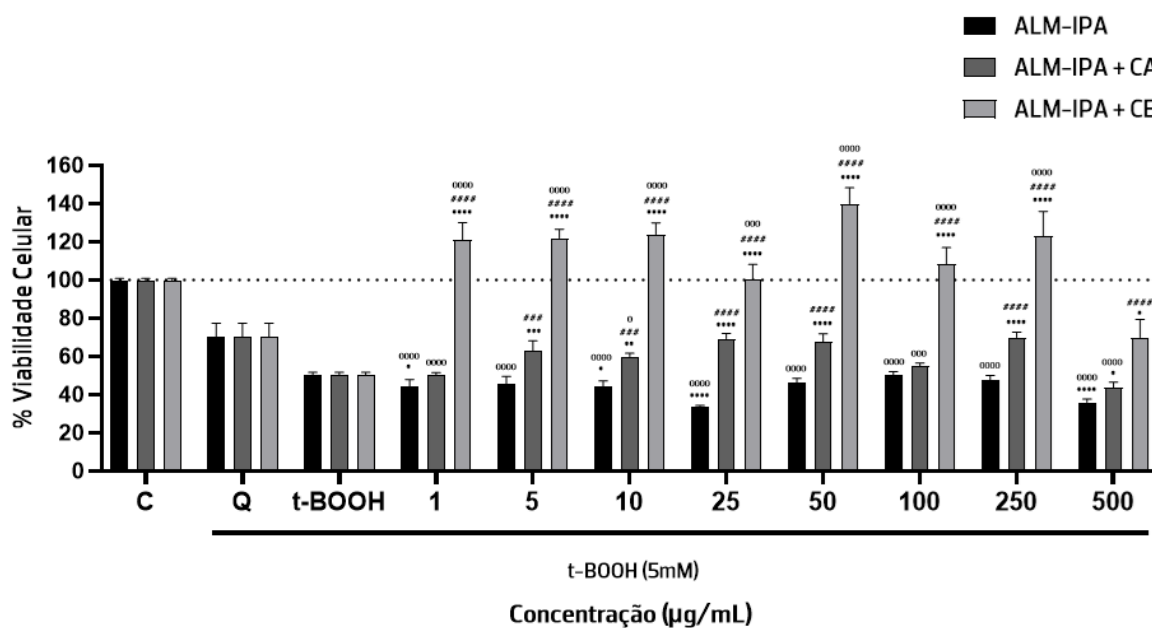


Figura 16 – Capacidade protetora, segundo o ensaio de pré-incubação, dos extratos da cerveja ALM-IPA e após a incorporação de extrato aquoso de *Prunus avium* Lapins (ALM-IPA + CA) e extrato etanólico de *Prunus avium* Lapins (ALM-IPA + CE) em células HaCaT. As comparações dos extratos com *t*-BOOH são representadas por \* ( $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). As diferenças entre a cerveja ALM-IPA e ALM-IPA + CA e ALM-IPA + CE são representadas por # ( $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$ ). As comparações dos extratos com a quercetina (Q) (50 µg/mL), controlo positivo, são representadas por 0 ( $p < 0,05$ ; 0<sup>0</sup> $p < 0,01$ ; 0<sup>00</sup> $p < 0,001$ ; 0<sup>000</sup> $p < 0,0001$ ). C – Controlo negativo (meio de cultura), *t*-BOOH - *tert*-butilhidroperóxido a 5 mM durante 2,5H.

A incorporação de extratos de cereja à cerveja ALM-IPA revelou-se promissora, dado que se observou um aumento da viabilidade celular para valores superiores às células incubadas com *t*-BOOH, atingindo viabilidades celulares superiores ao controlo negativo (meio), particularmente, para ALM-IPA + CE.

O extrato ALM-IPA + CA apresentou um aumento significativo face ao controlo com *t*-BOOH em todas as concentrações testadas exceto na concentração 1 µg/mL e 100 µg/mL ( $p < 0,05$  para a concentração 500 µg/mL,  $p < 0,01$  para a concentração 10 µg/mL,  $p < 0,0001$  para as restantes), sendo, também, nas mesmas concentrações onde não apresentou diferenças significativas com ALM-IPA. Nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 250 µg/mL a viabilidade celular encontrou-se compreendida entre 60–80%, não apresentando diferenças significativas com o controlo positivo, pelo que nestas concentrações o extrato demonstra uma ação equiparável à quercetina (controlo positivo), garantindo proteção contra os danos desencadeado pelo *t*-BOOH.

Por outro lado, ALM-IPA + CE exibiu uma capacidade protetora significativamente superior ao controlo positivo em todas as concentrações ( $p < 0,001$ ) à exceção da concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . É de salientar que o extrato não só demonstrou atividade comparável ao controlo positivo, como potenciou a diferenciação celular, superando o controlo negativo (meio) nas concentrações 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Na concentração 500  $\mu\text{g/mL}$  não era expectável proteção contra *t*-BOOH, dado que nos ensaios anteriores, esta se havia demonstrado desfavorável à viabilidade celular. No entanto, mesmo nesta concentração, o extrato ALM-IPA + CE induziu uma viabilidade celular superior às células apenas tratadas com *t*-BOOH, equiparável ao controlo positivo (quercetina).

Assim sendo, a associação de ALM-IPA com extrato CE revela-se promissora, conferindo capacidade para as células resistirem e se proliferarem após incubação com o agente indutor de toxicidade.

Tais resultados não eram expectáveis, dado que nem a cerveja ALM-IPA nem os extratos de cereja isolados (Figura 16 e Anexo 1 – Figura 22) apresentavam citoproteção contra *t*-BOOH, isoladamente, apresentando viabilidade celular significativamente inferior ao controlo positivo ( $p < 0,0001$ ) em todas as concentrações. Inclusive, CE apresentou viabilidade celular significativamente inferior às células tratadas com *t*-BOOH para todas as concentrações exceto 25  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, este apenas se demonstrou superior a CA na concentração 25  $\mu\text{g/mL}$ .

No estudo de Alonso-Andrés et al. (2019) os extratos de cerveja escura conferiram proteção contra o stress oxidativo induzido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , comparativamente aos extratos de cerveja sem álcool e cerveja Lager, em células C6 e SH-SY5Y durante 30 min e 24H de incubação. Os autores associam tais resultados ao maior TCF comprovado em outros estudos, contrariamente ao verificado no presente trabalho, sendo esperados melhores resultados de proteção da cerveja ALM-IPA pelo seu TCF (Alonso-Andrés et al., 2019).

Ao contrário dos resultados obtidos, no estudo de Letsiou et al. (2021) um extrato metanólico de cereja não só protegeu os fibroblastos (NHDF) do stress oxidativo induzido pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  como manteve a viabilidade celular. O mesmo se verificou no estudo de Letsiou et al., (2022), onde o extrato metanólico de cereja conferiu proteção dos queratinócitos (NHEK) contra  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 6. Conclusão

A cerveja artesanal é, efetivamente, uma bebida funcional que, pela complexidade da sua composição, congrega inúmeras propriedades benéficas para a saúde, com potenciais benefícios na área da cosmética. No entanto, a maioria dos estudos apenas avalia os potenciais benefícios das matérias-primas e dos subprodutos do seu fabrico, o que reitera a pertinência do presente estudo.

Assim, caracterizaram-se as cervejas incluídas (artesanais e industriais) quanto às suas características físico-químicas, potencial antioxidante (ensaio ABTS,  $H_2O_2$ , FRAP, ferrozina), fotoprotetor (FPS e capacidade de absorção UV) e atividade metabólica em células HaCaT (ensaio MTT). Para além disso, as mesmas atividades foram avaliadas após incorporação de extratos de cereja (aquoso e etanólico) na cerveja artesanal mais promissora a nível das atividades biológicas anteriormente determinadas, a fim de se perceber os potenciais sinergismos da associação. Adicionalmente, avaliou-se a capacidade da associação dos extratos de cereja com a cerveja artesanal selecionada em proteger as células HaCaT dos efeitos tóxicos desencadeados por *t*-BOOH.

A caracterização físico-química das cervejas decorreu pela análise da cor, amargor e teor alcoólico disponibilizados pelo fabricante e pela determinação laboratorial do pH, acidez e teor de açúcares redutores. A cor das cervejas artesanais variou entre 7 (EL-P) EBC e 98,2 (ALM-OS) EBC, nas cervejas industriais foi expressa em formato qualitativo. O teor de amargor variou entre 20 IBU (B-MD) e 98 IBU (EME-IS) para as cervejas artesanais, não se encontrando disponível nas cervejas industriais. As cervejas artesanais apresentaram maior teor alcoólico, entre 4,50% (V/V) (DC-IPA e M-P) e 8,00% (V/V) (EME-IS), comparativamente às cervejas industriais em estudo, igual 4,10% (V/V) (S-MD) e 5,00% (V/V) (S-P). A incongruência entre a disponibilidade de dados referentes à cor e amargor por parte do fabricante, sublinham a necessidade de regulamentação, a fim de todos os fabricantes determinarem os mesmos parâmetros nas mesmas condições, garantindo uniformidade nas informações disponíveis nos rótulos comerciais.

O pH das cervejas estudadas variou entre  $3,89 \pm 0,00$  (cerveja S-MD) e  $4,78 \pm 0,05$  (cerveja B-MD), o teor de acidez entre  $0,13 \pm 0,01\%$  (cerveja S-P e S-MD) e  $0,44 \pm 0,01\%$  (cerveja ALM-OS) de equivalentes de ácido láctico e o TAR entre  $1917,05 \pm 75,00$  mg de equivalentes de glicose/L e  $22255,00 \pm 25,00$  mg de equivalentes de glicose/L. Tais

parâmetros são determinantes na produção cervejeira dada a sua influência nos parâmetros sensoriais, na estabilidade biológica, química e no processo fermentativo.

Os compostos com maior interesse presentes nas cervejas são os compostos fenólicos, que não só podem contribuir para o amargor (sem correlação no presente trabalho) e adstringência da cerveja, como podem estar associados aos potenciais benefícios das cervejas, como a atividade antioxidante (correlação encontrada com o ensaio FRAP) e fotoprotetora (correlação encontrada com FPS). O TCF variou entre  $3,51 \pm 0,16$  mg de GAE/g (DC-IPA) e  $8,96 \pm 0,64$  mg de GAE/g (ALM-IPA) para as cervejas artesanais, sendo igual a  $5,17 \pm 0,08$  mg de GAE/g (S-P) e  $6,29 \pm 0,08$  mg de GAE/g (S-MD), nas cervejas industriais. Constatando-se, que o maior TCF foi encontrado numa cerveja clara, contudo, no presente estudo, não foi encontrada correlação entre o TCF e a cor das cervejas. É de salientar, que as cervejas industriais não apresentaram os menores valores de TCF, no entanto, estas apresentam menor TCF, comparativamente às cervejas artesanais do mesmo estilo.

No ensaio ABTS o  $IC_{50}$  variou entre  $38,74 \pm 0,47$   $\mu$ g/mL (DC-IPA) e  $108,98 \pm 5,44$   $\mu$ g/mL (EME-IS) nas cervejas artesanais e foram iguais a  $114,56 \pm 5,47$   $\mu$ g/mL e  $123,85 \pm 6,81$   $\mu$ g/mL para as cervejas industriais S-P e S-MD, respetivamente. No ensaio  $H_2O_2$  o  $IC_{50}$  variou entre  $13,85 \pm 1,30$   $\mu$ g/mL (DC-IPA) e  $40,92 \pm 1,34$   $\mu$ g/mL (EL-P) nas cervejas artesanais e nas cervejas industriais foi igual a  $50,92 \pm 3,24$   $\mu$ g/mL para S-P e  $50,65 \pm 5,04$   $\mu$ g/mL para S-MD. A impossibilidade de determinar o  $IC_{50}$  no ensaio da ferrozina indica que o  $IC_{50}$  é superior à concentração máxima testada, para todas as cervejas. Os valores de FRAP variaram entre  $33,98 \pm 2,21$   $\mu$ mol de trolox/g (EME-IS) e  $53,74 \pm 1,27$   $\mu$ mol de trolox/g (ALM-IPA) para as cervejas artesanais e foi igual a  $27,57 \pm 1,57$   $\mu$ mol de trolox/g para S-P e  $46,67 \pm 0,13$   $\mu$ mol de trolox/g para S-MD. Assim, a maior atividade antioxidante apresentada por DC-IPA, nos ensaios ABTS e  $H_2O_2$ , não foi concordante com o TCF determinado, podendo esta cerveja deter na sua composição outros compostos, além dos compostos fenólicos, que contribuam para esta atividade. Além disso, pelos ensaios ABTS e  $H_2O_2$ , as cervejas industriais apresentam menor atividade antioxidante, comparativamente às cervejas artesanais. Os diferentes valores obtidos corroboram a necessidade de realização de vários ensaios antioxidantes, a fim de se conhecer os possíveis mecanismos de atuação dos extratos.

As cervejas em estudo revelaram-se promissoras quanto à sua capacidade fotoprotetora contra a radiação UVA e UVB (FPS > 6). O FPS variou entre  $7,00 \pm 0,08$  (DC-IPA) e  $48,85 \pm 0,39$  (ALM-IPA) para as cervejas artesanais e foi igual a  $16,06 \pm 0,20$  e  $37,28 \pm 0,81$

para as cervejas industriais S-P e S-MD, respetivamente. Denotar que as cervejas industriais apresentaram menor FPS dentro do seu estilo em comparação com as cervejas artesanais.

No que concerne à capacidade de absorção UV, as cervejas EME-IS, ALM-OS e ALM-IPA destacaram-se pelos maiores valores de absorvância na gama de comprimentos de onda 250 – 450 nm.

Em termos metabólicos, os extratos de cerveja foram testados em dois períodos de incubação (24H e 48H), constatando-se uma diminuição da viabilidade celular no segundo tempo de incubação testado, pela possível acumulação de produtos tóxicos do metabolismo celular, bem como à limitação dos nutrientes disponíveis ao longo do tempo. De uma forma genérica, as cervejas em estudo não apresentaram citotoxicidade celular (viabilidade celular superior 80%) até à concentração 250 µg/mL. A concentração 500 µg/mL, maior concentração testada, promoveu uma diminuição da viabilidade celular, particularmente na incubação de 48H, à exceção das cervejas M-P e S-P, cuja viabilidade celular na concentração e tempo mencionados promoveram a proliferação celular. Assim, os extratos foram capazes de não só preservar a viabilidade das células HaCaT, como potenciar a sua diferenciação, podendo contribuir para a reepitelização de tecidos danificados.

Deste modo, a cerveja ALM-IPA destacou-se pelo maior TCF, valor de FRAP e FPS, pela atividade antioxidante moderada avaliada pelo ensaio ABTS ( $IC_{50} = 55,21 \pm 4,68$  µg/mL) e pela atividade antioxidante alta determinada pelo ensaio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $IC_{50} = 23,54 \pm 1,53$  µg/mL). Sendo, por isso, alvo de incorporação de extratos de cereja (aquoso e etanólico).

A avaliação dos parâmetros físico-químicos da cerveja ALM-IPA após a incorporação dos extratos de cereja sugere a ocorrência de alterações de cor, diminuição do pH e do TAR e aumento do teor de acidez.

A incorporação de extratos na cerveja após esta ser comercializada não se revelou vantajosa, pelo menos do modo em que foi feita e tendo em conta os ensaios efetuados no presente trabalho, pois verificou-se a diminuição do TCF (aquando da adição do CE), a diminuição da atividade antioxidante e da atividade fotoprotetora, ainda que o FPS seja superior a 6. É de salientar que a adição de CA na cerveja ALM-IPA contribuiu para o aumento do TCF.

No que concerne à atividade metabólica, a incorporação dos extratos de cereja garante a ausência de citotoxicidade até à concentração 250 µg/mL durante a incubação de 24H e até

à concentração 50 µg/mL durante a incubação de 48H, denotando-se menor viabilidade celular, pelos motivos apresentados.

Relativamente ao ensaio de pré-incubação, a incorporação de extratos de cereja na cerveja ALM-IPA revelou-se promissora, uma vez que ALM-IPA + CA apresentou ação comparável ao controlo positivo e ALM-IPA + CE, não só, protegeu as células dos danos desencadeados pelo tóxico, como promoveu a diferenciação celular, para valores superiores ao controlo positivo e negativo.

Em suma, com base nos resultados obtidos, constata-se que os extratos de cervejas artesanais apresentam atividade antioxidante, fotoprotetora e ausência de citotoxicidade em células HaCaT, evidenciando potenciais benefícios se incorporados em formulações cutâneas. Para além disso, o sinergismo entre o extrato de cerveja ALM-IPA com os extratos de cereja enfatiza as potencialidades dos extratos em prevenir os danos celulares induzidos pelo stress oxidativo. Todavia, estudos complementares são cruciais para aumento da evidência científica.

### **Limitações**

As limitações do presente trabalho foram:

- Tamanho amostral reduzido e falta de representatividade. Apesar de se terem incluído cervejas de sete marcas comerciais e seis estilos diferentes, denota-se o reduzido tamanho amostral e a falta de representatividade do mesmo, no que concerne à origem, marcas comerciais e estilos. Para além disso, apenas foram incluídas cervejas industriais portuguesas, ambas do estilo Lager.

### Perspetivas futuras:

O crescente mercado das cervejas artesanais, figurado na variabilidade de estilos e técnicas de fabrico, resultam em cervejas de composição distinta com impacto nas suas atividades biológicas. As aplicabilidades das cervejas artesanais na indústria cosmética é uma área pouco desenvolvida, reiterando a necessidade de estudos futuros. De entre os estudos/ensaios que poderiam vir a ser desenvolvidos, destacam-se:

- Seleção da amostra, garantindo que para cada estilo seja incluído cervejas artesanais e industriais de diferentes origens e marcas comerciais, garantindo a representatividade;
- Determinação dos parâmetros de EBC, IBU e teor alcoólico da cerveja ALM-IPA após incorporação dos extratos de cereja, a fim de se perceber o impacto do extrato nos parâmetros mencionados e, a possível ocorrência de refermentação pela alteração do teor alcoólico;
- Determinação do perfil fitoquímico das cervejas artesanais em estudo por HPLC, permitindo a identificação de possíveis compostos responsáveis pelas atividades em estudo e como a composição pode ser influenciada pela origem, estilo e marca comercial;
- Realização de outros estudos *in vitro* para aumentar a robustez científica dos mecanismos de ação das cervejas artesanais, como por exemplo o estudo do potencial anti-inflamatório, anticancerígeno, da atividade anti-elastase, anti-tirosinase, antibacteriana e a síntese de componentes da matriz celular; o estudo da atividade antioxidante e fotoprotetora em linhagens celulares cutâneas; o estudo de marcadores genéticos a fim de se auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação dos extratos;
- Proceder à incorporação dos extratos de cerveja em formulações cutâneas, avaliando a sua estabilidade e segurança;
- Dada a influência das técnicas extrativas no potencial do extrato, poderiam ser preparados outros extratos de cereja;
- Incorporação dos extratos de cereja em outras cervejas, pois as atividades podem ser potenciadas em outros estilos/marcas de cerveja;
- Incorporação concentrações superiores do extrato, a fim de se perceber a(s) mais promissora(s), tendo em conta as atividades estudadas;

- Estabelecimento de protocolos com cervejarias artesanais, a fim de se proceder à incorporação dos extratos de cereja em estudo em fases mais precoces do processo de fabrico das cervejas;
- Avaliação da possibilidade de serem incorporados outros extratos de interesse que se possam traduzir em atividades promissoras.

## 7. Referências bibliográficas

- Abate, M., Citro, M., Pisanti, S., Caputo, M., & Martinelli, R. (2021). Keratinocytes migration promotion, proliferation induction, and free radical injury prevention by 3-hydroxytyrosol. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2438). <https://doi.org/10.3390/ijms22052438>
- Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, *2*, 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
- Aguiar, D., Pereira, A. C., & Marques, J. C. (2022). The influence of transport and storage conditions on beer stability—A systematic review. *Food and Bioprocess Technology*, *15*, 1477–1494. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02790-8>
- Akazawa, H., Kohno, H., Tokuda, H., Suzuki, N., Yasukawa, K., Kimura, Y., Manosroi, A., Manosroi, J., & Akihisa, T. (2012). Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of 5-deprenyllupulonol C and other compounds from hop (*Humulus lupulus* L.). *Chemistry and Biodiversity*, *9*, 1045–1054. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100233>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Almendinger, M., Rohn, S., & Pleissner, D. (2020). Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *17*(100282). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100282>
- Alnuqaydan, A. M., Lenehan, C. E., Hughes, R. R., & Sanderson, B. J. (2014). Extracts from *Calendula officinalis* offer in vitro protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress cell

killing of human skin cells. *Phytotherapy Research*.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.5236>

Alonso-Andrés, P., Martín, M., & Albasanz, J. É. L. (2019). Modulation of adenosine receptors and antioxidative effect of beer extracts in in vitro models. *Nutrients*, *11*(1258).  
<https://doi.org/10.3390/nu11061258>

Alves, R. C., Costa, A. S. G., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M. J., & Oliveira, B. (2010). Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: Influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 12221–12229. <https://doi.org/10.1021/jf1031229>

Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. A. (2014). Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, *19*(5), 6202–6219.  
<https://doi.org/10.3390/molecules19056202>

American Cancer Society. (2024). *UV (Ultraviolet) radiation and cancer risk*. UV (Ultraviolet) radiation and cancer risk. <https://www.cancer.org/cancer/risk-prevention/sun-and-uv/uv-radiation.html>

Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, *1085*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>

Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, *41*, 214–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.12.005>

- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, *32*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Associação Cervejeiros de Portugal. (2021). *Cervejeiros em Portugal—Guia 2020/2021*.
- Astrup, A., Estruch, R., Hendriks, H., Kok, F., Marcos, A., Solfrizzi, V., & Zugravu, C.-A. (2016). Moderate consumption as part of a healthy lifestyle. *Beer and health*.
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Abdelgawad, A. A. M. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Natural and synthetic antioxidants*, *6*(8), 365–375. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>
- Baek, J., & Lee, M. G. (2016). Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report*, *21*(4), 164–169. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000015>
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*, 1829–1856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Bamforth, C. W. (2001). pH in brewing: An overview. *Technical Quarterly*, *38*(1).
- Bamforth, C. W. (2002). Nutritional aspects of beer—A review. *Nutrition Research*, *22*, 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00360-8)
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, *30*, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chemistry*, *173*, 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.145>

- Bayrak, Ç., Birinci, C., Kemal, M., & Kolayli, S. (2023). The phenolic composition and antioxidant properties of figs ( *Ficus carica* L.) grown in the Black Sea region. *Plant Foods for Human Nutrition*, *78*, 539–545. <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01089-z>
- Ben Salem, M., Affes, H., Athmouni, K., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., & Zeghal, K. M. (2017). Chemicals compositions, antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cynara scolymus* leaves extracts, and analysis of major bioactive polyphenols by HPLC. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/4951937>
- Betts, J. G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J. A., Womble, M., & Young, K. A. (2022). *Anatomy and Physiology* (2.<sup>a</sup> ed.). openstax.
- Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., & Malik, S. A. (2015). Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Research Notes*, *8*(279). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>
- Bortoleto, G. G., Gomes<sup>2</sup>, W. P. C., Ushimura, L. C., Bonança, R. A., & Novello, E. H. (2022). Evaluation of the profile of volatile organic compounds in industrial and craft beers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *12*(2).
- Bratu, M. M., Birghila, S., Popescu, A., Negreanu-Pirjol, B. S., Radu, M., & Birghila, C. (2021). Influence of packaging material on polyphenol content and antioxidant activity in some commercial beers. *processes*, *9*(620). <https://doi.org/10.3390/pr9040620>
- Breda, C., Barros, A. I., & Gouvinhas, I. (2022). Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *27*(100473). <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100473>

- Brewers Association. (n. d). *Craft brewer definition*. Craft brewer definition. <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
- Bucci, P. L., Santos, M. V., Montanari, J., & Zaritzky, N. (2020). Nanoferulic: From a by-product of the beer industry toward the regeneration of the skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(11), 2958–2964. <https://doi.org/10.1111/jocd.13407>
- Buiatti, S. (2009). Beer composition: An overview. Em *Beer in health and disease prevention* (1.ª ed., pp. 213–225). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00020-1>
- Burberg, F., & Zarnkow, M. (2009). Special production methods. Em *Handbook of brewing: Processes, technology, markets* (pp. 235–256). <https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch10>
- Burnham, T., Herz, J., Holl, J., Jones, C., Storey, M., Trautwein, L., Sparhawk, A., Puza, G., & Zander, N. (2018). Beer styles study guide. *Craft Beer.com*. <http://www.craftbeer.com/beer-styles-guide>
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porras, M. (2012). Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology*, 26, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Calado, L. S., Lacerda, A. L. F., Fiaux, S. B., Sphaier, L. A., Silva, V. N. H., & Peixoto, F. C. (2019). Low-cost fluorescence-based method for beer bitterness measurement. *Journal of Food Engineering*, 262, 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.015>
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 2017, 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.075>

- Cao, J., Jiang, Q., Lin, J., Li, X., Sun, C., & Chen, K. (2015). Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China. *Food Chemistry*, *173*, 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.094>
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, *284*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>
- Caro, D. D., Liguori, C., Pietrosanto, A., & Sommella, P. (2019). A low-cost device for beer color measurement. *2019 IEEE International Workshop on Metrology for Agriculture and Forestry (MetroAgriFor)*, 222–226. <https://doi.org/10.1109/MetroAgriFor.2019.8909213>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carvalho, N. B., Minim, L. A., Nascimento, M., Ferreira, G. H. de C., & Minim, V. P. R. (2018). Characterization of the consumer market and motivations for the consumption of craft beer. *British Food Journal*, *120*(2), 378–391. <https://doi.org/10.1108/BFJ-04-2017-0205>
- Causmaecker, B. D., Rouck, G. D., Aerts, G., Paternoster, A., Braet, J., & Cooman, L. D. (2019). Influence of transport and storage conditions on beer quality and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, *125*(1), 60–68. <https://doi.org/10.1002/jib.535>

- Ceccaroni, D., Sileoni, V., Marconi, O., De Francesco, G., Lee, E. G., & Perretti, G. (2019). Specialty rice malt optimization and improvement of rice malt beer aspect and aroma. *LWT - Food Science and Technology*, *99*, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.060>
- Censi, R., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Pruccoli, L., Tarozzi, A., Martino, P. D., Lupidi, G., & Angeloni, C. (2021). New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. *Cosmetics*, *8*(96). <https://doi.org/10.1201/9781315102535-6>
- Černáá, S., Benešováá, K., & Martíníka, J. (2023). Determination of organic acids in special beers and beer-based beverages using capillary isotachopheresis. *Chemické Listy*, *117*, 516–521.
- Cervejeiros de Portugal. (n. d). *Estilos de cerveja*. Cervejeiros de Portugal. <https://www.cervejeirosdeportugal.pt/variedades/>
- Chacón-Figueroa, I. H., Medrano-Ruiz, L. G., Moreno-Vásquez, M. de J., Ovando-Martínez, M., Gámez-Meza, N., Del-Toro-Sánchez, C. L., Castro-Enríquez, D. D., López-Ahumada, G. A., & Dórame-Miranda, R. F. (2022). Use of coffee bean bagasse extracts in the brewing of craft beers: Optimization and antioxidant capacity. *Molecules*, *27*(7755). <https://doi.org/10.3390/molecules27227755>
- Cheiran, K. P., Raimundo, V. P., Manfroi, V., Anzanello, M. J., Kahmann, A., Rodrigues, E., & Frazzon, J. (2019). Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, *286*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.198>

- Chen, W., Becker, T., Qian, F., & Ring, J. (2014). Beer and beer compounds: Physiological effects on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *28*, 142–150. <https://doi.org/10.1111/jdv.12204>
- Chiva-blanch, G., & Badimon, L. (2020). Benefits and risks of moderate alcohol consumption on cardiovascular disease: Current findings and controversies. *Nutrients*, *12*(108). <https://doi.org/10.3390/nu12010108>
- Choi, J. S., Kwon, Y. S., Jeong, S. T., Kang, H. Y., & Kang, J. E. (2022). Comparison of quality characteristics of commercially available ale-type and lager-type beers. *Korean Journal of Food Preservation*, *29*(2), 292–300.
- Cirlincione, F., Pirrone, A., Gugino, I. M., Todaro, A., Naselli, V., Francesca, N., Alfonzo, A., Mirabile, G., Ferraro, V., Balenzano, G., & Gargano, M. L. (2023). Technological and organoleptic parameters of craft beer fortified with powder of the culinary–medicinal mushroom *Pleurotus eryngii*. *Journal of Fungi*, *9*(1000). <https://doi.org/10.3390/jof9101000>
- Clodoveo, M. L., Crupi, P., Muraglia, M., Naeem, M. Y., Tardugno, R., Limongelli, F., & Corbo, F. (2023). The main phenolic compounds responsible for the antioxidant capacity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) pulp. *LWT*, *185*(115085). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115085>
- Coelho, M. M. V., Matos, T. R., & Apetato, M. (2016). The dark side of the light: Mechanisms of photocarcinogenesis. *Clinics in Dermatology*, *34*(5), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.05.022>
- Correia, A. C., González-SanJosé, M. L., Ortega-Heras, M., & Jordão, A. M. (2023). Preliminary study of the effect of short maceration with cherry and oak wood chips on the volatile composition of different craft beers. *Beverages*, *9*(79). <https://doi.org/10.3390/beverages9030079>

- Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Peregrina, D. V., Sagratini, G., Censi, R., & Di Martino, P. (2020). Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1612*(460622). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622>
- Costa, E. M., Oliveira, A. S., Silva, S., Ribeiro, A. B., Pereira, C. F., Ferreira, C., Casanova, F., Pereira, J. O., Freixo, R., Pintado, M. E., Carvalho, A. P., & Ramos, Ó. L. (2023). Spent yeast waste streams as a sustainable source of bioactive peptides for skin applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2253). <https://doi.org/10.3390/ijms24032253>
- Cunha, A. C. da, Sautter, C. K., Ballus, C. A., Lopes, N. D., & Barcia, M. T. (2023). Production and characterization of craft beers with different additions of native fruits and agro-industrial residues: A review. *Food Technology*, *53*(9). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220194>
- Dabrowska, A. K., Rotaru, G. M., Derler, S., Spano, F., Camenzind, M., Annaheim, S., Stämpfli, R., Schmid, M., & Rossi, R. M. (2016). Materials used to simulate physical properties of human skin. *Skin Research and Technology*, *22*, 3–14. <https://doi.org/10.1111/srt.12235>
- Dąbrowska, A. K., Spano, F., Derler, S., Adlhart, C., Spencer, N. D., & Rossi, R. M. (2017). The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Research and Technology*. <https://doi.org/10.1111/srt.12424>
- Data Bridge Market Research. (2022). *Global craft beer market – Industry trends and forecast to 2030*. Global craft beer market – Industry trends and forecast to 2030. <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-craft-beer-market>

- De la Cruz–Concepción, B., Espinoza–Rojo, M., Álvarez–Fitz, P., Illades–Aguilar, B., Acevedo–Quiroz, M., Zacapala–Gómez, A. E., Navarro–Tito, N., Jiménez–Wences, H., Torres–Rojas, F. I., & Mendoza–Catalán, M. A. (2021). Cytotoxicity of *Ficus crocata* extract on cervical cancer cells and protective effect against hydrogen peroxide–induced oxidative stress in HaCaT non–tumor cells. *Plants*, *10*(183). <https://doi.org/10.3390/plants10010183>
- Decreto lei nº 6.871, de 4 de junho de 209 (2009).
- Delanghe, T., Huyghe, J., Lee, S., Priem, D., Van Coillie, S., Gilbert, B., Choi, S. M., Vandenabeele, P., Degterev, A., Cuny, G. D., Dondelinger, Y., & Bertrand, M. J. M. (2021). Antioxidant and food additive BHA prevents TNF cytotoxicity by acting as a direct RIPK1 inhibitor. *Cell Death and Disease*, *12*(699). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03994-0>
- Di Lodovico, S., Menghini, L., Ferrante, C., Recchia, E., Castro–Amorim, J., Gameiro, P., Cellini, L., & Bessa, L. J. (2020). Hop extract: An efficacious antimicrobial and anti–biofilm agent against multidrug–resistant *Staphylococci* strains and *Cutibacterium acnes*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(1852). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01852>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro–Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Đorđević, S., Popović, D., Despotović, S., Veljović, M., Atanacković, M., Cvejić, J., Nedović, V., & Leskošek–Čukalović, I. (2016). Extracts of medicinal plants as functional beer additives. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, *22*(3), 301–308. <https://doi.org/10.2298/CICEQ150501044D>
- Dumas, E. R., Michaud, A. E., Bergeron, C., Lafrance, J. L., Mortillo, S., & Gafner, S. (2009). Deodorant effects of a supercritical hops extract: Antibacterial activity against

- Corynebacterium xerosis and Staphylococcus epidermidis and efficacy testing of a hops/zinc ricinoleate stick in humans through the sensory evaluation of axillary deodorancy. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8, 197–204.  
<https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2009.00449.x>
- Dutra, E. A., Da Costa E Oliveira, D. A. G., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Miritello Santoro, M. I. R. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), 381–385. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300014>
- Eom, S. J., Lim, T. G., Jhun, H., Lee, N. H., Kang, M. C., & Song, K. M. (2021). Inhibitory effect of *Saccharomyces cerevisiae* extract obtained through ultrasound-assisted extraction on melanoma cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76(105620).  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105620>
- Eßlinger, H. M. (2009). Fermentation, maturation and storage. Em *Brewing: Processes, Technology, Markets* (pp. 207–224).  
<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527623488>
- Europe Economics. (2020). The contribution made by beer to the European Economy. *The Brewers of Europe*.
- Ferreira, I. M., Carvalho, D. O., & Guido, L. F. (2023). Impact of storage conditions on the oxidative stability of beer. *European Food Research and Technology*, 249, 149–156.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-022-04140-6>
- Gabros, S., Nessel, T. A., & Zito, P. M. (2023). Sunscreens and photoprotection. *StatPearls*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537164/>

- Gary Spedding. (n. d.). *The Oxford Companion to Beer definition of acidity*. Craft beer & Brewing. <https://beerandbrewing.com/dictionary/Bc3C4qEYz3/>
- Gasinski, A., Kawa- Rygieslska, J., Szumny, A., Czubaszek, A., Gasior, J., & Pietrzak, W. (2020). Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). *Molecules*, *25*(3033).
- Gendrisch, F., Haarhaus, B., Krieger, N., Quirin, K. W., Schempp, C. M., & Wölfle, U. (2021). The effect of herbal medicinal products on psoriasis-like keratinocytes. *Biomolecules*, *11*(371). <https://doi.org/10.3390/biom11030371>
- Geoffrey, K., Mwangi, A. N., & Maru, S. M. (2019). Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*, 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.003>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12827). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gitika, B., Sai Ram, M., Sharma, S. K., Ilavazhagan, G., & Banerjee, P. K. (2006). Quercetin protects C6 glial cells from oxidative stress induced by tertiary-butylhydroperoxide. *Free Radical Research*, *40*(1), 95–102. <https://doi.org/10.1080/10715760500335447>
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., & Valentin, D. (2016). Craft vs. Industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, *96*, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.002>
- Gonçalves, A. C., Bento, C., Silva, B. M., & Silva, L. R. (2017). Sweet cherries from Fundão possess antidiabetic potential and protect human erythrocytes against oxidative damage. *Food Research International*, *95*, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.023>

- Gonçalves, A. C., Campos, G., Alves, G., Garcia-Viguera, C., Moreno, D. A., & Silva, L. R. (2020). Physical and phytochemical composition of 23 Portuguese sweet cherries as conditioned by variety (or genotype). *Food Chemistry*, 335(127637). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127637>
- Gonçalves, B., Silva, A. P., Vilela, A., Malheiro, A., Ribeiró, C., Bacelar, E., Raimundo, F., Guedes, F., Cortez, I., Sousa, J. R., Pereira, S., & Pinto, S. (2022). *Manual de boas práticas da cultura da cerejeira/ Resende* (B. Gonçalves & A. P. Silva, Eds.; 1.ª ed.).
- Gontijo, G. T., & Gontijo, G. (2009). Photoprotection. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 1(4), 186–192.
- Grand View Research. (2022). *Report cover beer market size, share & trends analysis report by product (Lager, Ale, Stout), by packaging (bottles, cans), by production (macro, micro, craft), by distribution channel (on-trade, off-trade), by region, and segment forecasts, 2022–20*. Grand View Research. <https://doi.org/978-1-68038-663-9>
- Grosshagauer, S., Kraemer, K., & Somoza, V. (2020). The true value of Spirulina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(14), 4109–4115. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08251>
- Guarner, F., Sanders, M., Szajewska, H., Cohen, H., Eliakim, R., Herrera, C., Karakan, T., Merenstein, D., Piscoya, A., Ramakrishna, B., & Salminen, S. (2023). Probióticos e prebióticos. *Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia*.
- Guillén-Mancina, E., Calderón-Montaña, J. M., & López-Lázaro, M. (2018). Avoiding the ingestion of cytotoxic concentrations of ethanol may reduce the risk of cancer associated with alcohol consumption. *Drug and Alcohol Dependence*, 183, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.11.013>

- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gülçin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., & Köksal, E. (2009). Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Science and Technology*, 43, 195–212. <https://doi.org/10.1007/s00226-008-0234-1>
- Hashemi, Z., Ebrahimzadeh, M. A., & Khalili, M. (2019). Sun protection factor, total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of medicinal plants from iran. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(7), 1443–1448. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i7.11>
- Hayaloglu, A. A., & Demir, N. (2015). Physicochemical characteristics, antioxidant activity, organic acid and sugar contents of 12 sweet cherry (*prunus avium* L.) cultivars grown in Turkey. *Journal of Food Science*, 80(3), C564–C570. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12781>
- Hinojosa-Avila, C. R., García-Gamboa, R., Chedraui-Urrea, J. J. T., & García-Cayuela, T. (2024). Exploring the potential of probiotic-enriched beer: Microorganisms, fermentation strategies, sensory attributes, and health implications. *Food Research International*, 175(113717). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113717>
- Holbrook, C. J. (2020). Brewhouse operations. Em *The Craft Brewing Handbook: A Practical Guide to Running a Successful Craft Brewery* (pp. 65–109). Elsevier LTD. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00003-5>
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanu, G., & Aprodu, I. (2020). Value-added lager beer enriched with eggplant (*Solanum melongena* L.) peel extract. *Molecules*, 25(731). <https://doi.org/10.3390/molecules25030731>

- Horn, P. A., Pedron, N. B., Junges, L. H., Rebelo, A. M., da Silva Filho, H. H., & Zeni, A. L. B. (2021). Antioxidant profile at the different stages of craft beers production: The role of phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 247, 439–452. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03637-2>
- Howe, S. (2020). Raw materials. Em *The craft brewing handbook* (pp. 1–46). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00001-1>
- Hu, T., Subbiah, V., Wu, H., BK, A., Rauf, A., Alhumaydhi, F. A., & Suleria, H. A. R. (2021). Determination and characterization of phenolic compounds from Australia-Grown sweet cherries (*Prunus avium* L.) and their potential antioxidant properties. *ACS Omega*, 6, 34687–34699. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05112>
- Hurth, Z., Faber, M. L., Gendrisch, F., Holzer, M., Haarhaus, B., Cawelius, A., Schwabe, K., Schempp, C. M., & Wölfle, U. (2022). The anti-inflammatory effect of *Humulus lupulus* extract in vivo depends on the galenic system of the topical formulation. *Pharmaceuticals*, 15(350). <https://doi.org/10.3390/ph15030350>
- IL Presidente della Repubblica. (1962). *Legge 16 de agosto 1962, n.º1354–Disciplina igienica della produzione e del commercio della birra*. <https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:legge:1962;1354>
- Ilieva, Y., Dimitrova, L., Zaharieva, M. M., Kaleva, M., & Alov, P. (2021). Cytotoxicity and microbicidal activity of commonly used organic solvents: A Comparative study and application to a standardized extract from *Vaccinium macrocarpon*. *toxics*, 9(92).
- ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. (2009). Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Em *International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland*.

- Jardim, C. da C., Souza, D. de, Machado, I. C. K., Pinto, L. M. N., Ramos, R. C. de S., & Garavaglia, J. (2018). Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. *Beverages*, 4(106). <https://doi.org/10.3390/beverages4040106>
- Jastrzebski, Z., Gorinstein, S., Czyzewska-Szafran, H., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Trakhtenberg, S., & Remiszewska, M. (2007). The effect of short-term lyophilized beer consumption on established hypertension in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.08.007>
- Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2004). Antioxidant activities of flavidin in different in vitro model systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 5141–5146. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.028>
- Jesus, A., Sousa, E., Cruz, M. T., Cidade, H., Lobo, J. M. S., & Almeida, I. F. (2022). UV filters: Challenges and prospects. *Pharmaceuticals*, 15(263). <https://doi.org/10.3390/ph15030263>
- Jiang, T. A. (2019). Health benefits of culinary herbs and spices. *Journal of AOAC International*, 102(2), 395–411. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0418>
- Junior, A. A. D., Vieira, A. G., & Ferreira, T. P. (2009). Processo de produção de cerveja. *Revista Processos Químicos*, 61–71. <https://doi.org/10.19142/rpq.v03i06.p61-71.2009>
- Jusvick, A. C., Quatrin, R., Schons, A. M., Pagno, R., & Piana, M. (2022). Avaliação do fator de proteção solar in vitro de extratos de *Vitis labrusca* e desenvolvimento de um gel. *Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas*, 6(1), 47–58. <https://doi.org/10.31512/ricsb.v6i1.1188>
- Kent, K., Hölzel, N., & Swarts, N. (2018). Polyphenolic compounds in sweet cherries: A focus on anthocyanins. Em *Polyphenols: Mechanisms of action in human health and disease* (pp. 103–118). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00010-6>

- Khavkin, J., & Ellis, D. A. F. (2011). Aging skin: Histology, physiology, and pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003>
- Kim, D. W., Woo, H. S., Kim, J. Y., Ryuk, J. A., Park, K. H., & Ko, B. S. (2016). Phenols displaying tyrosinase inhibition from *Humulus lupulus*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(5), 742–747. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1063621>
- Kuete, V., & Efferth, T. (2010). Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology*, 1(123). <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00123>
- Kunz, T., Lee, E. J., Schiwiek, V., Seewald, T., & Methner, F. J. (2011). Glucose—A reducing sugar? Reducing properties of sugars in beverages and food. *BrewingScience*, 64, 61–67.
- Kurzawa, M., Wilczyńska, E., Brudzyńska, P., & Sionkowska, A. (2022). Total phenolic content, antioxidant capacity and UV radiation protection properties of marigold (*Calendula officinalis*), carrot (*Daucus carota*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and hop (*Humulus lupulus*) extracts. *Cosmetics*, 9(134). <https://doi.org/10.3390/cosmetics9060134>
- Labrado, D., Ferrero, S., Caballero, I., Alvarez, C. M., Villafane, F., & Blanco, C. A. (2020). Identification by NMR of key compounds present in beer distillates and residual phases after dealcoholization by vacuum distillation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(10), 3971–3978. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10441>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 107–115). <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

- Latha, M. S., Martis, J., Shobha, V., Shinde, R. S., Bangera, S., Krishnankutty, B., Bellary, S., Varughese, S., Rao, P., & Kumar, B. R. N. (2013). Sunscreening agents: A review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, *6*(1), 16–26.
- Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Taidi, B., & Ennahar, S. (2011). Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 1249–1255. <https://doi.org/10.1021/jf104094c>
- Letsiou, S., Ganopoulos, I., Kapazoglou, A., Xanthopoulou, A., Sarrou, E., Tanou, G., & Molassiotis, A. (2022). Probing the effects of sweet cherry (*Prunus avium* L.) extract on 2D and 3D human skin models. *Molecular Biology Reports*, *49*, 2687–2693. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07076-4>
- Letsiou, S., Karamaouna, A., Ganopoulos, I., Kapazoglou, A., Xanthopoulou, A., Sarrou, E., Tanou, G., & Molassiotis, A. (2021). The pleiotropic effects of *Prunus avium* L. extract against oxidative stress on human fibroblasts. An in vitro approach. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06464-0>
- Liu, J., Chen, Y., Zhang, X., Zheng, J., Hu, W., & Teng, B. (2022). Hop tannins as multifunctional tyrosinase inhibitor: Structure characterization, inhibition activity, and mechanism. *Antioxidants*, *11*(772). <https://doi.org/10.3390/antiox11040772>
- Liu, Y., Liu, X., Zhong, F., Tian, R., Zhang, K., Zhang, X., & Li, T. (2011). Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal of Food Science*, *76*(4), C633–C638. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02150.x>
- Livens, S. (2016). Encyclopedia of food and health. Em *Beer: Fermentation* (pp. 339–344). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00059-3>

- Loh, L. X., Ng, D. H. J., Toh, M., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2021). Targeted and nontargeted metabolomics of amino acids and bioactive metabolites in probiotic-fermented unhopped beers using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*, 14024–14036. [https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C03992/SUPPL\\_FILE/JF1C03992\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C03992/SUPPL_FILE/JF1C03992_SI_001.PDF)
- Lorencová, E., Salek, R. N., Černošková, I., & Buňka, F. (2019). Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control*, *106*(106706), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106706>
- Lukinac, J., & Jukić, M. (2022). Barley in the production of cereal-based products. *Plants*, *11*(3519). <https://doi.org/10.3390/plants11243519>
- Luo, Y., Kong, L., Xue, R., Wang, W., & Xia, X. (2020). Bitterness in alcoholic beverages: The profiles of perception, constituents, and contributors. *Trends in Food Science and Technology*, *96*, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.026>
- Luz, B. (2023). *Annual volume of beer consumed per capita in Portugal from 2008 to 2021*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/447124/portugal-volume-beer-consumption-per-capita/#:~:text=This statistic shows the annual volume of beer,amounted to 48 liters per capita in 2021>
- Madrau, M. A., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Fadda, C., & Piga, A. (2010). Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of prunes. *Journal of Food Quality*, *33*, 155–170. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00328.x>
- Maehle, R. C. N. (2021). Case studies in the beer sector. Em *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817734-1.00022-7>

- Mahayothee, B., Koomyart, I., Khuwijitjaru, P., Siriwongwilaichat, P., Nagle, M., & Müller, J. (2016). Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties*, *19*, 2041–2051. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1099042>
- Maia, P. D. D. S., Baião, D. dos S., Silva, V. P. F. da, Miguel, M. A. L., Lacerda, E. C. Q., Calado, V. M. de A., Carneiro, C. da S., Finotelli, P. V., & Pierucci, A. P. T. R. (2020). Microencapsulation of a craft beer, nutritional composition, antioxidant stability, and drink acceptance. *LWT*, *133*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110104>
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *microorganisms*, *8*(1142). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Malsawmtluangi, C., Nath, D. K., Jamatia, I., Lianhingthangi, E. Z., & Pachuau, L. (2013). Determination of sun protection factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*(9), 150–151. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3925>
- Mancuso, J. B., Maruthi, R., Wang, S. Q., & Lim, H. W. (2017). Sunscreens: An Update. *American Journal of Clinical Dermatology*, *18*, 643–650. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0290-0>
- Mansur, J. S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. A., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol., Rio de Janeiro*, *61*, 121–124.
- Marcos, A., Serra-Majem, L., Pérez-Jiménez, F. J., Pascual, V., Tinahones, F. J., & Estruch, R. (2021). Moderate consumption of beer and its effects on cardiovascular and metabolic health: An updated review of recent scientific evidence. *Nutrients*, *13*(879). <https://doi.org/10.3390/nu13030879>

- Marktest, G. (2022). 686 mil consumidores de cerveza artesanal. *Marktest*.  
<https://www.marktest.com/wap/a/n/id-290a.aspx>
- Marques, D. R., Cassis, M. A., Quelhas, J. O. F., Bertozzi, J., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., & Monteiro, A. R. G. (2017). Characterization of craft beers and their bioactive compounds. *Chemical Engineering Transactions*, *57*, 1747–1752.  
<https://doi.org/10.3303/CET1757292>
- Marques, P., Marto, J., Gonçalves, L. M., Pacheco, R., Fitas, M., Pinto, P., Serralheiro, M. L. M., & Ribeiro, H. (2017). Cynara scolymus L.: A promising mediterranean extract for topical anti-aging prevention. *Industrial Crops and Products*, *109*, 699–706.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.033>
- Martínez-Inda, B., Esparza, I., Moler, J. A., Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2023). Valorization of agri-food waste through the extraction of bioactive molecules. Prediction of their sunscreen action. *Journal of Environmental Management*, *325*(116460). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116460>
- Matteo, A. D., Russo, R., Graziani, G., Ritieni, A., & Vaio, C. D. (2016). Characterization of autochthonous sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) of southern Italy for fruit quality, bioactive compounds and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *9*(9). <https://doi.org/10.1002/cnma.202300020>
- Mayer, H., Ceccaroni, D., Marconi, O., Sileoni, V., Perretti, G., & Fantozzi, P. (2016). Development of an all rice malt beer: A gluten free alternative. *LWT – Food Science and Technology*, *67*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.037>
- Mejía-Giraldo, J. C., Winkler, R., & Puertas-Mejía, M. (2021). Novel UV filters from *Pentacalia pulchella* extracts with photoprotective properties and antioxidant activity.

*Photochemical and Photobiological Sciences*, 20, 1585–1597.

<https://doi.org/10.1007/s43630-021-00120-z>

- Merinas-Amo, T., Tasset-Cuevas, I., Díaz-Carretero, A. M., Alonso-Moraga, Á., & Calahorro, F. (2016). In vivo and in vitro studies of the role of lyophilised blond Lager beer and some bioactive components in the modulation of degenerative processes. *Journal of Functional Foods*, 27, 274–294. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.014>
- Millucci, L., Minetti, M., Orlandini, M., Braconi, D., Lucia, M., Galderisi, S., Marzocchi, B., Spiga, O., Rappuoli, R., Sprea, A., Perretti, G., & Bernardini, G. (2019). Beer promotes differentiation and mineralization of human osteoblastic cells: Role of silicon. *Journal of Functional Foods journal*, 54, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.023>
- Mitchell, D., Haven, J., Pixley, D., Pupo, T., Pattinson, R., Blake, D., Feltus, A., Fitzpatrick, T., Linsner, M., Zainasheff, J., Beechum, D., Belanger, C., Harting, D., Hayes, A., Jankowski, B., Korty, A., Nadeau, L., Scott, W. S., Smith, R., ... Muñoz, C. (2021). Directrices de estilos de cerveza 2021. *Beer Judge Certification Program*.
- Mitterer-Daltoé, M., Bordim, J., Lise, C., Breda, L., Casagrande, M., & Lima, V. (2021). Consumer awareness of food antioxidants. Synthetic vs. Natural. *Food Science and Technology*, 41(1), 208–212. <https://doi.org/10.1590/fst.15120>
- Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S. K., & Shah, D. (2017). Ultraviolet radiations: Skin defense-damage mechanism. In *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (Vol. 996, pp. 71–87). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7)
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63. <https://doi.org/10.1039/c6ra17788c>

- Mota, M. D., Costa, R. Y. S., Guedes, A. aa S., Silva, L. C. R. C. e., & Chinalia, F. A. (2019). Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *201*(111639). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111639>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3380). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mwene-Mbeja, T. M. (2020). Chemistry of organic compounds in the beer production. *Edelweiss Journal of Food Science and Technology*, *1*(1), 32–35. <https://doi.org/10.33805/2765.8821.107>
- Nagy, G., Kiraly, G., & Banfalvi, G. (2012). Optimization of cell cycle measurement by time-lapse microscopy. Em *Methods in Cell Biology* (Vol. 112, pp. 143–161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00007-X>
- Nardini, M., & Foddai, M. S. (2020). Phenolics profile and antioxidant activity of special beers. *Molecules*, *25*(2466). <https://doi.org/10.3390/molecules25112466>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2018). Effect of sulfites on antioxidant activity, total polyphenols, and flavonoid measurements in white wine. *Foods*, *7*(35). <https://doi.org/10.3390/foods7030035>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2020). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, *305*(125437). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>
- Nedyalkov, P., Bakardzhiyski, I., Shikov, V., Kaneva, M., & Shopska, V. (2023). Possibilities for utilization of cherry products (juice and pomace) in beer production. *Beverages*, *9*(95). <https://doi.org/10.3390/beverages9040095>

- Negrão, R., Costa, R., Duarte, D., Gomes, T. T., Coelho, P., Guimarães, J. T., Guardão, L., Azevedo, I., & Soares, R. (2012). Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*, 100–109. <https://doi.org/10.1002/jcb.23332>
- Ngoc, L. T. N., Tran, V. V., Moon, J. Y., Chae, M., Park, D., & Lee, Y. C. (2019). Recent trends of sunscreen cosmetic: An update review. *Cosmetics*, *6*(64). <https://doi.org/10.3390/COSMETICS6040064>
- Nitulescu, G., Lupuliasa, D., Adam-Dima, I., & Nitulescu, G. M. (2023). Ultraviolet filters for cosmetic applications. *Cosmetics*, *10*(101). <https://doi.org/10.3390/cosmetics10040101>
- Nizioł-Lukaszewska, Z. (2019). Extracts of cherry and sweet cherry fruit as active ingredients of body wash formulations. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *47*(1), 100–107. <https://doi.org/10.15835/nbha47111212>
- Nothaft, A. (2003). Encyclopedia of food sciences and nutrition. Em *Beers/Microbreweries* (p. 448). Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01361-4>
- Nova, E., Baccan, G. C., Veses, A., Zapatera, B., & Marcos, A. (2012). Potential health benefits of moderate alcohol consumption: Current perspectives in research. *Proceedings of the Nutrition Society*, *71*, 307–315. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000171>
- Nunes Filho, R. C., Galvan, D., Effting, L., Terhaag, M. M., Yamashita, F., Benassi, M. de T., & Spinosa, W. A. (2021). Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. *Food Chemistry*, *365*(130478). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130478>
- Oliveira, A. I., Pinho, C., Fonte, P., Sarmiento, B., & Dias, A. C. P. (2018). Development, characterization, antioxidant and hepatoprotective properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)

- nanoparticles loaded with a neuroprotective fraction of *Hypericum perforatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *110*, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.103>
- Opriş, O., Soran, M. L., Lung, I., Stegarescu, A., Guţoiu, S., Podea, R., & Podea, P. (2021). Optimization of extraction conditions of polyphenols, antioxidant capacity and sun protection factor from *Prunus spinosa* fruits. Application in sunscreen formulation. *Journal of the Iranian Chemical Society*, *18*, 2625–2636. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02217-9>
- Pai, T. V., Sawant, S. Y., Ghatak, A. A., Chaturvedi, P. A., Gupte, A. M., & Desai, N. S. (2015). Characterization of Indian beers: Chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(3), 1414–1423. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1152-2>
- Paredes-Ramos, M., Conde Piñeiro, E., & Lopez Vilariño, J. M. (2022). Brewers' spent hop revalorization for the production of high added-value cosmetics ingredients with elastase inhibition capacity. *Scientific Reports*, *12*(22074). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26149-3>
- Paternoster, A., Van Camp, J., Vanlanduit, S., Weeren, A., Springael, J., & Braet, J. (2017). The performance of beer packaging: Vibration damping and thermal insulation. *Food Packaging and Shelf Life*, *11*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.004>
- Petrón, M. J., Andrés, A. I., Esteban, G., & Timón, M. L. (2021). Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. *Journal of Cereal Science*, *98*(103162). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103162>

- Petruk, G., Giudice, R. D., Rigano, M. M., & Monti, D. M. (2018). Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1454936). <https://doi.org/10.1155/2018/1454936>
- Piazzon, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10677–10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8790). <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>
- Pilli, T. de, Lopriore, G., Montemitro, M., & Alessandrino, O. (2019). Effects of two sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L., cvv. 'Ferrovia' and 'Lapins') on the shelf life of an innovative bakery product. *Journal of Food Science and Technology*, 56(1), 310–320. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3491-5>
- Pires, J. S., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29127.80809>
- Piva, R. C., Verdan, M. H., Mascarenhas Santos, M. do S., Batistote, M., & Cardoso, C. A. L. (2021). Manufacturing and characterization of craft beers with leaves from *Ocimum selloi* benth. *Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 4403–4410. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04925-1>
- Pokrivčák, J., Supeková, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Tóth, M., & Vašina, R. (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(1), 63–74.

Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro, Diário da República, 1.ª Série 4 (2022).

Poveda, J. M. (2019). Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food Control*, 96, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012>

Priyanka, S., Inala, M. S. R., Nandini, H., Kutty, A., & Kiranmayee, P. (2018). A pilot study on sun protection factor of plant extracts: An observational study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(4), 67–71. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i4.23671>

Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 169, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>

Quitmann, H., & Czermak, R. F. and P. (2013). Acidic organic compounds in beverage, food, and feed production. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 143, 91–141. <https://doi.org/10.1007/10>

Recomendação da comissão de 22 de setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares, Jornal Oficial da União Europeia (2006). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0647&from=EN>

Regulamento (CE) N.º1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos, Jornal Oficial da União Europeia (2009).

Rinaldi, B. J. D., Montanher, P. F., & Johann, G. (2022). Brewing of craft beer enriched with freeze-dried cape gooseberry: A promising source of antioxidants. *Brazilian Journal of Food Technology*, 25(2022019). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.01922>

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Em Assay guidance manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- Ritter, S., Dölle, K., Bargen, M., & Piatkowski, J. (2016). Fruits in craft beer: A study to evaluate the impact of fruits on the pH in the brewing process and the breweries waste water. *Advances in Research*, *8*(4). <https://doi.org/10.9734/air/2016/30228>
- Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., Valls-Belles, V., Codoñer, P., & Muñiz, P. (2005). Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3637–3642. <https://doi.org/10.1021/jf048146v>
- Rosales, A., Talaverano, M. I., Lozano, J., Sánchez-Vicente, C., Santamaría, Ó., García-Latorre, C., & Rodrigo, S. (2021). Craft beer vs industrial beer: Chemical and sensory differences. *British Food Journal*, *123*(12), 4332–4346. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2021-0074>
- Rossi, F., Spigno, G., Luzzani, G., Bozzoni, M. E., Donadini, G., Rolla, J., & Bertuzzi, T. (2021). Effects of the intake of craft or industrial beer on serum homocysteine. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *72*(1), 93–98. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1760219>
- Rossi, S., Sileoni, V., Perretti, G., & Marconi, O. (2014). Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*, 919–928. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6336>
- Salantă, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Pop, C. R., Tofană, M., Mudura, E., Bors, A., Pasqualone, A., & Zhao, H. (2020). Non-alcoholic and craft beer production and challenges. *Processes*, *8*(1382).

- Santa, O. R. D., Silva, N. S. R. da, Rosa, C. T., Micheletti, I. N., Kruger, R. L., Mesomo, M. C., & Zanette, C. M. (2020). Brewing with addition of artichoke. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 72918–72928. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-660>
- Sayre, R. M., Agin, P. P., Levee, G. J., & Marlowe, E. (1978). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*, 29, 559–566.
- Schalka, S., & dos Reis, V. M. S. (2011). Sun protection factor: Meaning and controversies. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 507–515. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300013>
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Scioli, G., Della, A., Zengin, G., Locatelli, M., Tartaglia, A., Cichelli, A., Stefanucci, A., & Mollica, A. (2022). Artisanal fortified beers: Brewing, enrichment, HPLC-DAD analysis and preliminary screening of antioxidant and enzymatic inhibitory activities. *Food Bioscience*, 48(101721). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101721>
- Segawa, S., Kuroda, H., Kaneko, T., & Watari, J. (2008). Oral administration of a hop water extract ameliorates the development of dermatitis induced by the periodical topical application of a mite antigen in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(4), 974–981. <https://doi.org/10.1271/bbb.70695>
- Shon, Y. J., Kim, W. C., Lee, S. H., Hong, S., Kim, S. Y., Park, M. H., Lee, P., Lee, J., Park, K. H., Lim, W., & Lim, T. G. (2023). Antimelanogenic potential of brewer's spent grain extract through modulation of the MAPK/MITF axis. *Sustainable Materials and Technologies*, 38(e00721). <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00721>

- Shopska, V., Denkova-Kostova, R., Dzhivoderova-Zarcheva, M., Teneva, D., Denev, P., & Kostov, G. (2021). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity of different malt types. *Antioxidants*, *10*(1124).  
<https://doi.org/10.3390/antiox10071124>
- Shopska, V., Nedyalkov, P., Shikov, V., & Kaneva, M. (2023). Effect of cherry products addition on beer fermentation. *BIO Web of Conferences*, *102*(01016).  
<https://doi.org/10.1051/bioconf/202410201016>
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*, 1633–1644.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Silva, M. C., Anjos, J. P. dos, Guarieiro, L. L. N., & Machado, B. A. S. (2021). A simple method for evaluating the bioactive phenolic compounds' presence in brazilian craft beers. *Molecules*, *26*(4716). <https://doi.org/10.3390/molecules26164716>
- Silva, S., Oliveira, A. I., Cruz, A., Oliveira, R. F., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical properties and antioxidant activity Portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, *27*(8007). <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>
- Socha, R., Pająk, P., Fortuna, T., & Buksa, K. (2017). Antioxidant activity and the most abundant phenolics in commercial dark beers. *International Journal of Food Properties*, *20*(1), S595–S609. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1306550>
- Spagnuolo, C., Tedesco, I., Volpe, M. G., Bilotto, S., Russo, M., & Russo, G. L. (2014). Cytotoxic properties of lyophilized beers in a malignant cell line. *Food and Nutrition Sciences*, *5*, 45–51.

- Średnicka-Tober, D., Ponder, A., Hallmann, E., Głowacka, A., & Rozpara, E. (2019). The profile and content of polyphenols and carotenoids in local and commercial sweet cherry fruits (*Prunus avium* L.) and their antioxidant activity in vitro. *Antioxidants*, *8*(534). <https://doi.org/10.3390/antiox8110534>
- Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *69*, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.014>
- Szweda, S. L. (2023). *Guide: 3 types of beer*. Midtfyns Bryghus. <https://midtfyns-bryghus.dk/guide-3-types-of-beer/?lang=en>
- Tafulo, P. A. R., Queirós, R. B., Delerue-Matos, C. M., & Sales, M. G. F. (2010). Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*, *43*, 1702–1709. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.014>
- Taiti, C., Stefano, G., Percaccio, E., Di Giacomo, S., Iannone, M., Marianelli, A., Di Sotto, A., & Garzoli, S. (2023). Addition of spirulina to craft beer: Evaluation of the effects on volatile flavor profile and cytoprotective properties. *Antioxidants*, *12*(1021). <https://doi.org/10.3390/antiox12051021>
- Tedesco, I., Nappo, A., Petitto, F., Iacomino, G., Nazzaro, F., Palumbo, R., & Russo, G. L. (2005). Antioxidant and cytotoxic properties of lyophilized beer extracts on HL-60 cell line. *Nutrition and Cancer*, *52*(1), 74–83. <https://doi.org/10.1207/s15327914nc5201>
- Thesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. *Current protocols in microbiology*, *54*(91). <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>
- Tirado-Kulieva, V. A., Hernández-Martínez, E., Minchán-Velayarce, H. H., Pasapera-Campos, S. E., & Luque-Vilca, O. M. (2023). A comprehensive review of the benefits of drinking

craft beer: Role of phenolic content in health and possible potential of the alcoholic fraction. *Current Research in Food Science*, 6(100477). <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100477>

Tomazelli, L. C., de Assis Ramos, M. M., Sauce, R., Cândido, T. M., Sarruf, F. D., de Oliveira Pinto, C. A. S., de Oliveira, C. A., Rosado, C., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2018). SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen. *International Journal of Pharmaceutics*, 552, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.015>

Troilo, A., Francesco, G. de, Marconi, O., Sileoni, V., Turchetti, B., & Perretti, G. (2019). Low carbohydrate beers produced by a selected yeast strain from an alternative source. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(1), 80–88. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1682887>

Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the addition of propolis extract on bioactive compounds and antioxidant activity of craft beer. *Journal of Chemistry*, 2017(6716053). <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>

Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C. dos, & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24094.64322>

Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., & Gargano, M. L. (2021). Medicinal mushrooms: Bioactive: Compounds, use, and clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(634). <https://doi.org/10.3390/ijms22020634>

Viana, A. C., Pimentel, T. C., Borges do Vale, R., Clementino, L. S., Januario Ferreira, E. T., Magnani, M., & dos Santos Lima, M. (2021). American Pale Ale craft beer: Influence of

- brewer's yeast strains on the chemical composition and antioxidant capacity. *LWT*, *152*(112317). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112317>
- Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*, *45*(101495). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101495>
- Wang, L., Hong, K., Agbaka, J. I., Song, Y., Lv, C., & Ma, C. (2022). Characterization of bitter-tasting and antioxidant activity of dry-hopped beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(11), 4843–4853. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11847>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, *217*(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Weber, N., Biehler, K., Schwabe, K., Haarhaus, B., Quirin, K. W., Frank, U., Schempp, C. M., & Wölfle, U. (2019). Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, *24*(223). <https://doi.org/10.3390/molecules24020223>
- Wenz, C., Faust, D., Linz, B., Turmann, C., Nikolova, T., Bertin, J., Gough, P., Wipf, P., Schröder, A. S., Krautwald, S., & Dietrich, C. (2018). T-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Archives of Toxicology*, *92*, 759–775. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2066-y>
- WHO. (2022). *Ultraviolet radiation*. World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ultraviolet-radiation?fbclid=IwAR39976xw\\_Xnj\\_umK1aCjyjCsXeSloDTQlIEWYpWPU8yL0P8\\_aeBEiCyWsY](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ultraviolet-radiation?fbclid=IwAR39976xw_Xnj_umK1aCjyjCsXeSloDTQlIEWYpWPU8yL0P8_aeBEiCyWsY)

- Wilson, V. G., Griffin, L. M., Cicchini, L., Xu, T., & Pyeon, D. (2014). Epidermal cells methods and protocols. Em *Epidermal cells methods and protocols* (3.<sup>a</sup> ed.). Humana Press.  
<https://doi.org/10.1385/1592598307>
- Wu, J., Zhang, Y., Qiu, R., Li, L., & Zong, X. (2024). Effects of tea addition on antioxidant capacity, volatiles, and sensory quality of beer. *Food Chemistry: X*, *21*(101193).  
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101193>
- Wunderlich, S., & Back, W. (2009). Overview of manufacturing beer: Ingredients, processes, and quality criteria. Em *Beer in health and disease prevention* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 3–16).
- Zhang, P., Hai, H., Sun, D., Yuan, W., Liu, W., Ding, R., Teng, M., Ma, L., Tian, J., & Chen, C. (2019). A high throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC Biotechnology*, *19*(30). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0525-7>
- Zhao, H. (2014). Endogenous antioxidants and antioxidant activities of beers. Em *Processing and impact on antioxidants in beverages* (pp. 15–24). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00002-7>
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, *119*, 1150–1158.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>
- Zhao, H., Li, H., Sun, G., Yang, B., & Zhao, M. (2012). Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(4), 910–917. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5824>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1990). Carbohydrates: Reducing sugars. Em *Production Wine Analysis* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 114–115). Springer.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395629-3.50019-2>

Zou, W., Ramanathan, R., Urban, S., Sinclair, C., King, K., Tinker, R., & Bansal, V. (2022).

Sunscreen testing: A critical perspective and future roadmap. *Trends in Analytical Chemistry*, 157(116724). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116724>

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo 1 – Resultados complementares da atividade metabólica e protetora dos extratos em estudo em células HaCaT

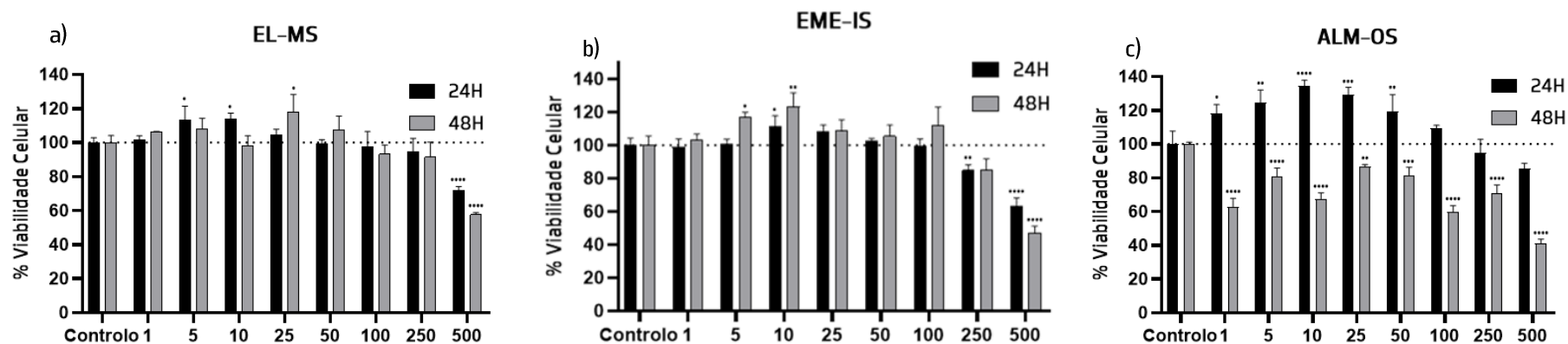


Figura 17 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Stout: a) cerveja EL-MS, b) cerveja EME-IS, e c) cerveja ALM-OS. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

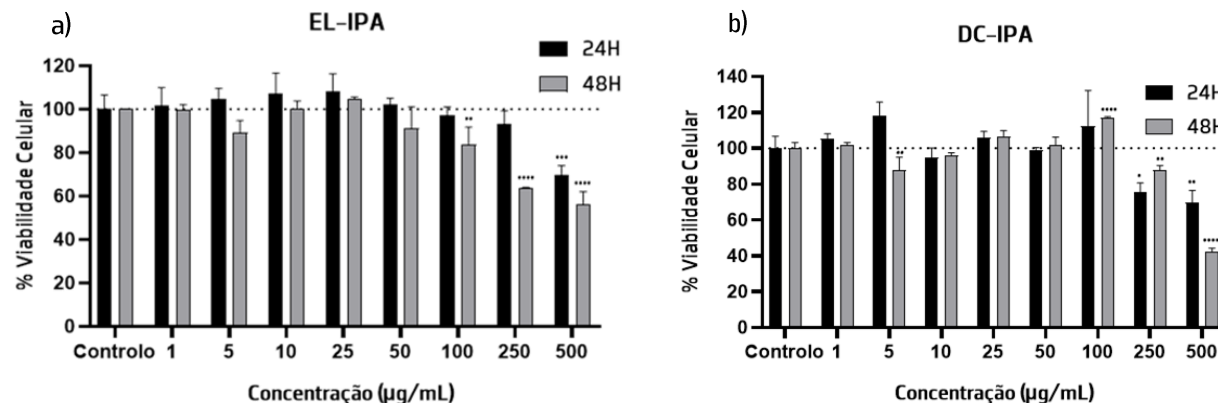


Figura 18– Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo India Pale Ale: a) cerveja EL-IPA, b) cerveja DC-IPA. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

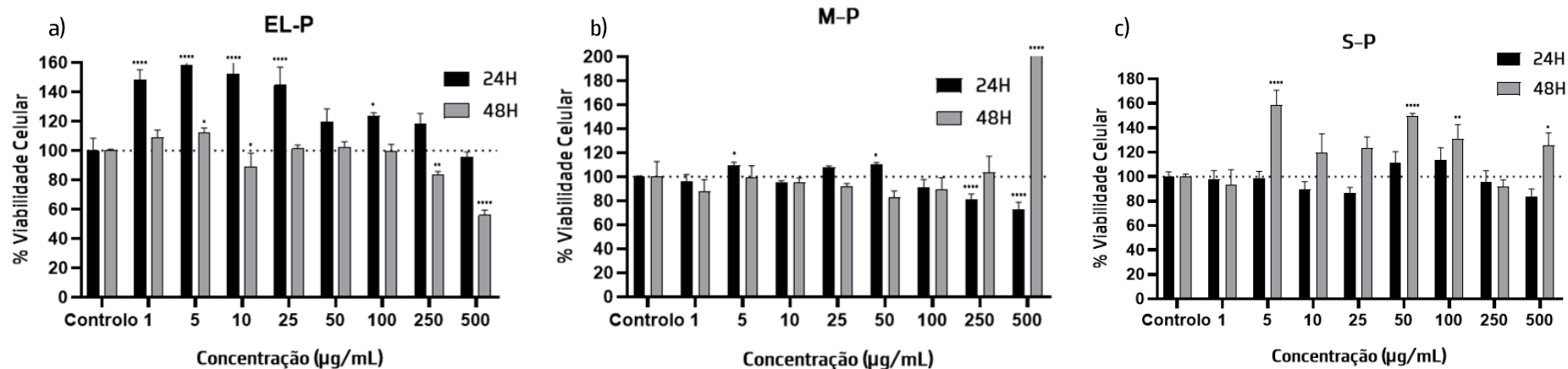


Figura 19 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Pilsner: a) cerveja EL-P, b) cerveja M-P e c) cerveja S-P. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

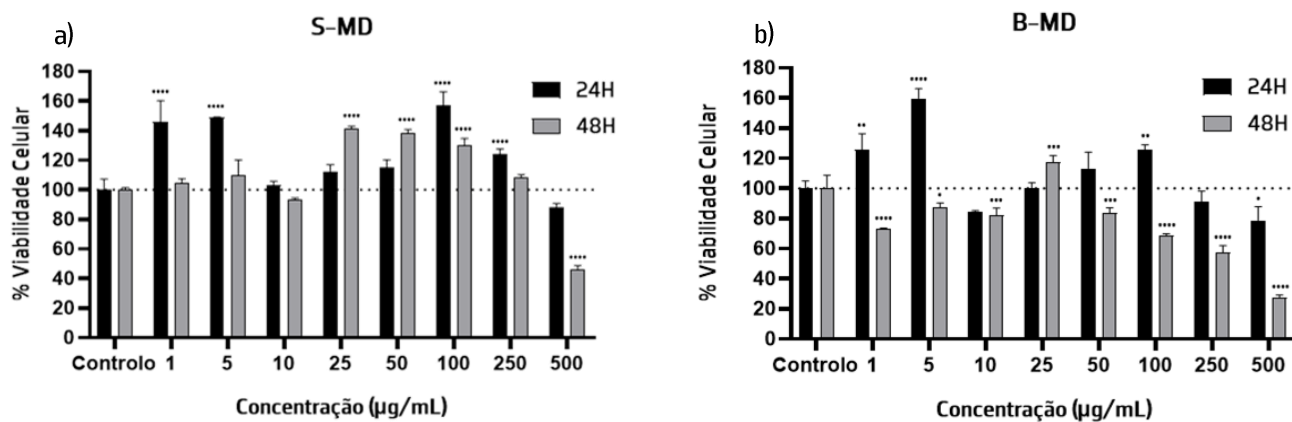


Figura 20 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com cervejas do estilo Munich Dunkel: a) cerveja S-MD e b) cerveja B-MD. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

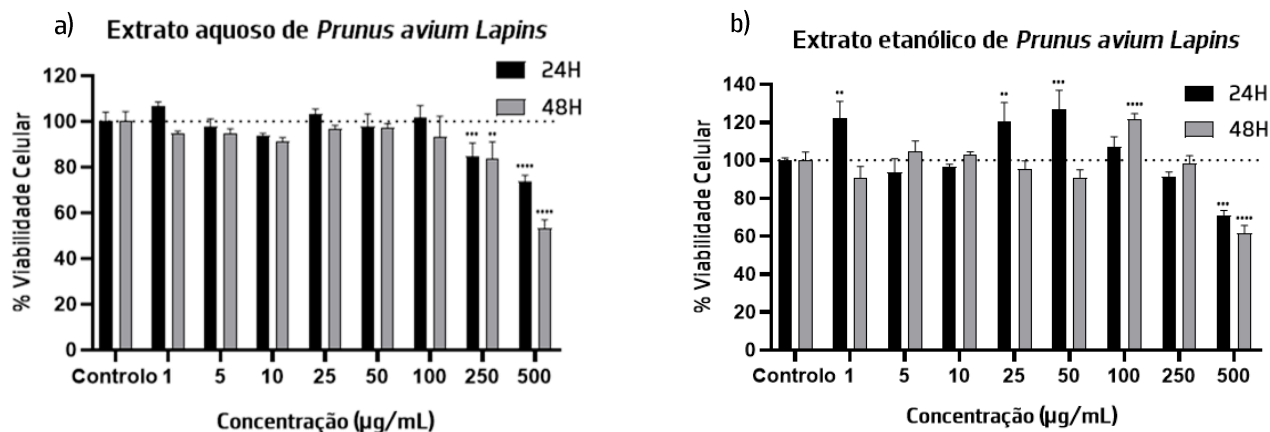


Figura 21 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio MTT após 24H e 48H de incubação de células HaCaT com extratos de *Prunus avium* Lapins: a) aquoso e b) etanólico. Os resultados são expressos em comparação com o controlo negativo (meio de cultura). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

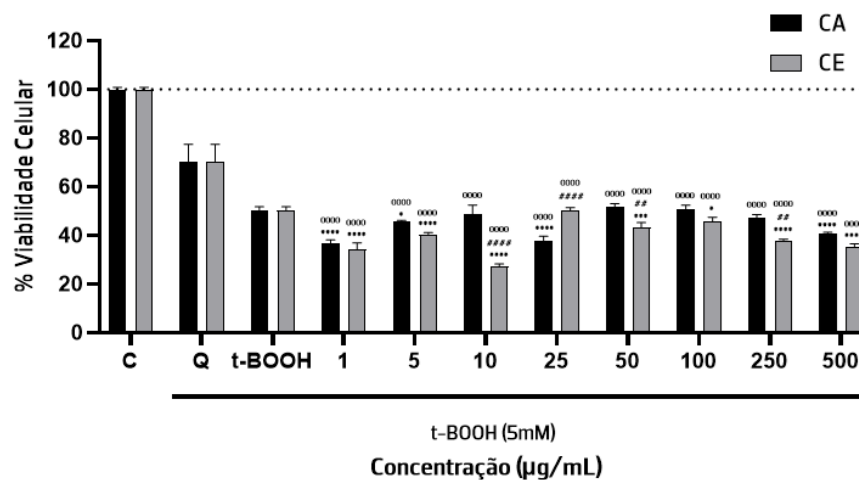


Figura 22 - Capacidade protetora, segundo o ensaio de pré-incubação, dos extratos aquoso (CA) e etanólico (CE) de *Prunus avium* Lapins em células HaCaT. As comparações dos extratos com t-BOOH são representadas por \* ( $p < 0,05$ ); \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). As diferenças entre os extratos de cereja são representadas por # ( $p < 0,05$ ); ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,0001$ ). As comparações dos extratos com t-BOOH são representadas por 0 ( $p < 0,05$ ); 00 $p < 0,01$ ; 000 $p < 0,001$ ; 0000 $p < 0,0001$ . C – Controlo negativo (meio de cultura), Q – quercetina a 50 µg/mL (controlo positivo), t-BOOH – tert-butilhidroperóxido a 5 mM durante 2,5H.

## 9. Apêndice

### Apêndice I

Resumo publicado na revista Proceedings of Research and Practice in Allied and Environmental Health.



ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



#### A importância dos probióticos nas cervejas artesanais: revisão narrativa

Diana Santos<sup>1\*</sup>, Maria João Pereira<sup>1</sup>, Fernando Moreira<sup>2</sup>, Luísa Barreiros<sup>1,3</sup>, Ana Isabel Oliveira<sup>2</sup>, Cláudia Pinho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>2</sup> Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>3</sup> LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

\*drdianasantos@gmail.com

**Introdução:** A cerveja constitui uma bebida funcional dado o seu valor nutritivo e possível enriquecimento com ingredientes inovadores, que lhe confere propriedades nutricionais benéficas para a saúde do consumidor [1,2]. Assim, os probióticos são ingredientes ativos passíveis de serem adicionados, pelas inúmeras vantagens na saúde do hospedeiro [3]. Os alimentos funcionais contendo probióticos são geralmente produtos lácteos. Como tal, a funcionalidade probiótica deve ser confirmada noutros veículos. **Objetivos:** Discutir a viabilidade e os benefícios da incorporação de probióticos em cervejas artesanais. **Metodologia:** Revisão narrativa com pesquisa de artigos na base de dados PubMed, utilizando os termos de pesquisa "probiotics", "beer" e "craft beer" combinadas com os operadores booleanos "OR" e "AND". Incluíram-se artigos com referência a benefícios da incorporação de probióticos nas cervejas artesanais, em língua inglesa e portuguesa, não tendo sido estabelecidos limites temporais. **Resultados:** As cervejas artesanais não são filtradas nem pasteurizadas o que lhes confere, genericamente, maior teor de compostos fenólicos totais (TPC) e maior atividade antioxidante [1]. A ausência destas etapas, apesar de fundamentais para a garantia de isenção de contaminações, potencia os benefícios desta cerveja, e a incorporação de probióticos [4]. A incorporação de *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* em co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* na cerveja artesanal, revelou-se promissora e viável, tendo-se atingido um elevado número de células viáveis ( $8,0 \times 10^6$ – $7,0 \times 10^7$  células/mL). Denotou-se ainda o aumento da atividade antioxidante e do teor de polifenóis na cerveja [4]. Por sua vez, durante a co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, a bactéria *Lactobacillus paracasei* L26 manteve uma elevada viabilidade ( $>10^8$  CFU/mL), evidenciando a boa compatibilidade entre os dois microrganismos [5]. Também a fermentação da cerveja com *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 demonstrou um TPC e atividade antioxidante elevados [6]. **Conclusão:** A incorporação de probióticos nas cervejas artesanais pode ser uma opção promissora na otimização das propriedades antioxidantes e compostos fenólicos, bem como na contribuição para a manutenção da microbiota intestinal.


**Palavras-chave:** Atividade antioxidante; cerveja artesanal; *Lactobacillus paracasei* L26; probióticos; *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*;

#### Referências


- [1] Baiano A. Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021; 20:1829-1856.
- [2] Habschied K, Živković A, Krstanović V, Mastanjević K. Functional beer - A review on possibilities. *Beverages* 2020;6.
- [3] Mack DR. Probiotics: Mixed messages. *Canadian Family Physician*. 2005;51(11):1455.
- [4] Capece A, Romaniello R, Pietrafesa A, et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*. 2018; 284:22-30.
- [5] Alcine Chan MZ, Chua JY, Toh M, Liu SQ. Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during cofermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiology*. 2019; 82:541-550.
- [6] Loh LX, Ng DHJ, Toh M, Lu Y, Liu SQ. Targeted and nontargeted metabolomics of amino acids and bioactive metabolites in probiotic-fermented unhopped beers using liquid chromatography high-Resolution mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2021;69(46):14024-14036.

## Apêndice II

Póster apresentado nas "I Jornadas do CISA: Jovens com a Ciência".



**ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE**



**CISA**  
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

# I Jornadas do CISA: Jovens com a Ciência

## A Importância dos Probióticos nas Cervejas Artesanais: Revisão Narrativa

Diana Santos<sup>1</sup>; Maria João Pereira<sup>1</sup>; Fernando Moreira<sup>2</sup>; Luísa Barreiros<sup>1,3</sup>; Ana Isabel Oliveira<sup>2</sup>; Cláudia Pinho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>2</sup> Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>3</sup> LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal  
\*drdianasantos@gmail.com

### INTRODUÇÃO

A cerveja constitui uma bebida funcional dado o seu valor nutritivo e possível enriquecimento com ingredientes inovadores, que lhe confere propriedades nutricionais benéficas para a saúde do consumidor<sup>1,2</sup>. Assim, os probióticos são ingredientes ativos passíveis de serem adicionados, pelas inúmeras vantagens na saúde do hospedeiro<sup>3</sup>. Os alimentos funcionais contendo probióticos são geralmente produtos lácteos. Como tal, a funcionalidade probiótica deve ser confirmada noutros veículos.

#### OBJETIVOS



Discutir a viabilidade e os benefícios da incorporação de probióticos em cervejas artesanais.

#### METODOLOGIA

- 1 - Base de dados: PubMed
- 2 - Palavras-chave: "probiotics", "beer" e "craft beer"  
- Operadores booleanos: "OR" e "AND"
- 3 - Língua: inglesa e portuguesa  
- Sem limites temporais

### RESULTADOS/DISCUSSÃO

- ✓ Verifica-se que a incorporação de probióticos na cerveja artesanal é uma mais valia, dado os benefícios que estes revelam ter na saúde do indivíduo;
- ✓ Denota-se a necessidade de otimização dos processos de incorporação dos probióticos na cerveja artesanal, pois temperaturas elevadas, pasteurização e filtração podem comprometer a sua a sua viabilidade e, conseqüentemente, os seus benefícios;
- ✓ As etapas de pasteurização e filtração estão associadas à diminuição de contaminantes, porém a sua ausência confere, genericamente, maior teor de compostos fenólicos totais e maior atividade antioxidante às cervejas artesanais.

Tabla 1 – Resultados dos artigos alvo da análise na presente revisão narrativa.

Referência	Probióticos	Resultado
(Capece et al., 2018)	Co-fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	✓ Aumento atividade antioxidante; ✓ Aumento do teor de polifenóis; ✓ Número elevado de células viáveis (8,0x10 <sup>8</sup> -7,0x10 <sup>9</sup> células/mL); ✓ Não afetou negativamente o aroma da cerveja.
(Loh et al., 2021)	Co-fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WB-06 com <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Lpo-37 (PB); Co-fermentação de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 com <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Lpo-37 (PYPB)	✓ Ambas apresentam aumento dos níveis de teor de compostos fenólicos totais; ✓ Apenas PB apresentou aumento da capacidade antioxidante.
(Alcine Chan et al., 2019)	Co-fermentação de <i>Lactobacillus paracasei</i> L26 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S-04	✓ Elevada estabilidade; ✓ Elevada viabilidade celular (>10 <sup>8</sup> CFU/mL).
(Silva et al., 2021)	Co-fermentação de <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> DTA 81 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> 17	✓ Ambos têm potencial efeito antidepressivo; ✓ <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> 17 apresenta elevada produção de ácido acético, pelo stress celular, conferindo gosto residual.
(Oliveira et al., 2022)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905	✓ Cerveja artesanal não filtrada com probiótico: - Reduziu a mortalidade e a perda de peso de ratos infetados pela bactéria <i>Salmonella Typhimurium</i> . - Manutenção das propriedades probióticas da levedura; - Efeito protetor pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias e das alterações histopatológicas.
(Ramirez-Cota et al., 2021)	<i>S. cerevisiae</i> vs. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	✓ <i>S. boulardii</i> demonstrou boa tolerância ao etanol, quando cultivada a 28°C; ✓ Incorporação promissora na produção de cerveja artesanal.

### CONCLUSÃO

A incorporação de probióticos nas cervejas artesanais pode ser uma opção promissora na otimização das propriedades antioxidantes e compostos fenólicos, bem como na contribuição para a manutenção da microbiota intestinal.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Basso A, Dall'Acqua A, et al. *Comp. Rev. Food Sci. Technol.* 2021;23(10):1989-99. doi:10.1590/1981-8122-2020-0133. <https://doi.org/10.1590/1981-8122-2020-0133>

2. Basso A, Dall'Acqua A, et al. *Comp. Rev. Food Sci. Technol.* 2021;23(10):1989-99. doi:10.1590/1981-8122-2020-0133. <https://doi.org/10.1590/1981-8122-2020-0133>

3. Basso A, Dall'Acqua A, et al. *Comp. Rev. Food Sci. Technol.* 2021;23(10):1989-99. doi:10.1590/1981-8122-2020-0133. <https://doi.org/10.1590/1981-8122-2020-0133>

## Apêndice III

Póster apresentado no XIX Colóquio de Farmácia – Saúde Mental: Desafios, Abordagens Terapêuticas e perspectivas atuais.



# CERVEJAS ARTESANAIS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE



Diana Santos<sup>1</sup>; Maria João Pereira<sup>1</sup>; Ana Isabel Oliveira<sup>1,2,3</sup>; Cláudia Pinho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>2</sup>Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>3</sup>Laboratório de Química Verde (LAQV)/REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
 drs@ess.ipp.pt

### INTRODUÇÃO

A cerveja artesanal é composta por quatro ingredientes base, ou seja, água, malte, lúpulo e leveduras. Esta é uma matriz rica em compostos antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos, flavonoides, flavanonas e os derivados dos flogoglucínios, o que releva o interesse do seu estudo dada a escassez de evidências científicas<sup>1,2,3</sup>. Deste modo, surge a possibilidade de correlacionar uma bebida alcoólica a benefícios para a saúde.

### OBJETIVOS

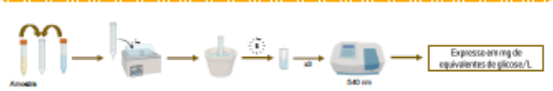
Avaliar, *in vitro* a atividade antioxidante de extratos aquosos de cervejas artesanais.

### MÉTODOS

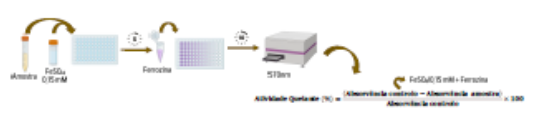
#### 1. Obtenção e tratamento das cervejas artesanais



#### 2. Ensaio do teor de açúcares redutores (TAR)



#### 3. Ensaio da atividade quelante de metais (ferrozina)



#### 4. Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)



#### 5. Teor de compostos fenólicos totais (TCF)



### RESULTADOS/ DISCUSSÃO

- ✓ Quanto aos açúcares redutores (Tabela 1), o TAR varia entre 136–475 g por garrafa de 0,33L, sendo os valores superiores aos mencionados por Silva et al. (2022) (0,857 a 1,467g por 0,33L), podendo ser justificado pela utilização de diferentes cervejas. O TAR varia entre estilos de cervejas artesanais, o que influencia o processo de fermentação da cerveja<sup>4</sup>.
- ✓ O TCF variou entre 4,07 e 8,15 mg GAE/g, em que as cervejas Stout (ESF-IS e EL-MS) demonstraram maiores teores, porém, próximos às cervejas claras. A literatura não é consistente na correlação entre o TCF e a coloração da cerveja. Nos estudos de Censi et al. (2021) e Silva et al. (2022) as cervejas escuras (ex: Estilo Stout) contém um maior TCF, enquanto no estudo de Breda et al. (2022) verifica-se um maior TCF em cervejas claras.

Tabela 1. Resultados relativos ao teor de álcool, TAR e TCF nas cervejas analisadas.

Cerveja	Estilo	Teor de álcool	TAR (mg de equivalentes de glicose/L)	Ensaio TCF (mg GAE/g)
ESF-IS	Imperial Stout	9,10%	14392,50 ± 0,00	7,68 ± 0,00
EL-MS	Milk Stout	6,20%	10617,50 ± 0,00	8,15 ± 0,09
EPT-DB	Dubbel Belga	6,80%	8392,50 ± 0,00	6,20 ± 0,00
EL-IPA	India Pale Ale	6,80%	5046,67 ± 0,00	7,59 ± 0,28
EPT-PA	Pale Ale	6,00%	4121,67 ± 0,00	4,07 ± 0,46

- ✓ Os compostos antioxidantes caracterizam-se pela capacidade de prevenir ou retardar a oxidação, através da inibição de enzimas oxidantes, pela quelação de iões metálicos e neutralização de radicais livres pela doação de átomos de hidrogénio ou de eletrões<sup>5,6</sup>.
- ✓ No ensaio da ferrozina as percentagens de inibição variaram entre 21,96 ± 2,03 (ESF-IS) e 41,60 ± 0,28 (EL-IPA), sendo estas percentagens dependentes da concentração.
- ✓ O ensaio FRAP mede o potencial antioxidante em amostras através da redução do ferro férrico (Fe<sup>3+</sup>) a ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) pelos antioxidantes presentes. Os valores variaram entre 162,07 ± 1,33 μMol TE/10mg (EPT-DB) e 309,40 ± 0,00 μMol TE/10mg (EL-IPA) (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos dos ensaios da ferrozina e FRAP.

Cerveja	Ferrozina (% inibição)	FRAP (μMol TE/10mg)
IESF-IS	21,96 ± 2,03	303,07 ± 5,67
EL-MS	29,12 ± 2,81	272,07 ± 2,67
EPT-DB	25,26 ± 1,13	162,07 ± 1,33
EL-IPA	41,60 ± 0,28	309,40 ± 0,00
EPT-PA	27,86 ± 0,75	215,40 ± 5,33

- ✓ Os resultados observados, em particular para a cerveja EL-IPA, podem advir da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na cerveja



- ✓ Compostos fenólicos como o ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, luteolina, epicatequina, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina e ácido trans-cinâmico já foram detetados em cervejas artesanais<sup>7</sup>.

### CONCLUSÃO

Em suma, as amostras em estudo revelam um poder antioxidante promissor. No entanto, outros ensaios antioxidantes devem ser realizados com o intuito de se averiguar outros mecanismos antioxidantes. Além disso, o tamanho amostral deve ser aumentado afim de se obter resultados mais robustos para cada estilo de cervejas artesanais.


### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Censi R, Vargas Perregino D, Gagliabico MR, Lupatig G, Angeletti P, Puccilli, et al. New Antioxidant Ingredients from Brewery Products for Cosmetic Formulations. *Cosmetics*. 2021;8(4):95. // 2. Silva S, Oliveira A, Cruz A, Oliveira R, Almeida R, Pinho C. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Portuguese Craft Beers and Raw Materials. *Molecules*. 2022;27(2):580-001. // 3. Chen W, Becker T, Qian F, Shi R, Liu J, et al. Bioactive compounds: Physiological effects on skin health. *Journal of Functional Foods*. 2021;42:104511. // 4. Zhang P, Hai H, Sun D., Yuan W, Liu W, Ding R., Teng M., Jia L., Tan L., G. Chen C. 2019. A High-throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC Biotechnology*. 19:42. // 5. Ara EM, Mohamed NH. Antioxidants: An overview on the natural/synthetic types. *Nat Synth antioxidants*. 2018;8(3):65-75. // 6. Bak L, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep*. 2016;21(4):164-9. // 7. Breda CB, Barros AI, Gouveias L. Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *Int J Gastron Food Sci*. 2022;27.



## Apêndice V

Póster apresentado no XIX Colóquio de Farmácia – Saúde Mental: Desafios, Abordagens Terapêuticas e perspectivas atuais.




ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

# Cervejas Artesanais:

## Avaliação da Atividade Fotoprotetora

Maria João Pereira<sup>1</sup>; Nuno Gomes<sup>1</sup>, Cláudia Pinho<sup>2</sup>; Ana Isabel Oliveira<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>2</sup>Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
<sup>3</sup>Laboratório de Química Verde (LAQV)/REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal  
\*psj@ess.ipp.pt



### Introdução

Em 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde, a exposição solar causou cerca de 1,2 milhões de novos casos de cancro cutâneo<sup>1</sup>. Deste modo, denota-se a importância de se utilizarem formulações com agentes fotoprotetores, como os compostos antioxidantes<sup>2</sup>.

A cerveja artesanal é uma matriz rica em compostos fenólicos e com atividade antioxidante descrita na literatura<sup>3</sup>. Porém, o seu potencial de fotoproteção é desconhecido, o que realça a pertinência do presente trabalho.

### Objetivo

✓ Avaliar, *in vitro*, a capacidade de fotoproteção de extratos aquosos de cervejas artesanais.

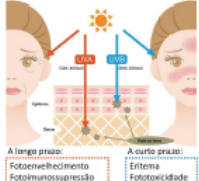




Fig. 1- Danos cutâneos decorrentes da exposição solar<sup>4</sup> (UVA- radiação ultravioleta A, UVB- radiação ultravioleta B)

### Metodologia


#### 1. Preparação dos extratos das cervejas artesanais



#### 2. Preparação do controlo positivo (CP)




#### 3. Determinação do fator de proteção solar (FPS)



$FPS = CP \times \frac{I_0}{I} \times \frac{A_0}{A}$

CP- Fator de correção  
I- Intensidade da radiação no comprimento de  $\lambda$   
A- Absorvância no comprimento de  $\lambda$

#### 4. Capacidade de absorção ultravioleta (UV)



coeficiente de absorção =  $\frac{\text{Absorvância}}{\text{Camada}} \times 100$

### Resultados/ Discussão

- ✓ Os protetores solares destinam-se a proteger a pele das radiações UV, face à sua capacidade em absorver e refletir esta radiação. Idealmente, estes devem ser de amplo espectro conferindo proteção contra as radiações UVA (320–400nm) e UVB (290–320nm)<sup>5,6</sup>.
- ✓ Foram incluídas 4 cervejas artesanais, cujos estilos encontram-se descritos na tabela 1.
- ✓ De acordo com a Regulamentação Europeia n.º 647/2006 de 22 de setembro apenas compostos com um FPS >6 conferem proteção contra as radiações UV<sup>7</sup>. Assim, pela análise da tabela 2, os extratos de cerveja artesanal apresentam resultados promissores na fotoproteção da pele.
- ✓ Relativamente à capacidade de absorção UV, os extratos de cerveja artesanal superam o CP nos comprimentos de onda 250, 400 e 450 nm (tabela 3). Os comprimentos de onda 250 e 450 nm estão fora do espectro de proteção do CP, pelo que tais resultados são previsíveis, o que não acontece com o comprimento de 400 nm<sup>8</sup>.
- ✓ As cervejas EL-MS e a ESF-IS sendo cervejas artesanais escuras, poderão apresentar maior teor de compostos fenólicos<sup>3,9</sup>, o que pode justificar o FPS e valores de capacidade de absorção UV superior às demais.
- ✓ É de salientar que os protetores solares comerciais resultam, geralmente, de uma associação de filtros solares físicos e químicos, pelo que é expectável que o CP possua melhores perfis em termos de FPS e capacidade de absorção UV em detrimento dos extratos de cervejas artesanais em estudo<sup>9</sup>.

**Tabela 1 – Estilo das cervejas artesanais**

Amostras	Estilo
EL-MS	Milk Stout
EL-IPA	India Pale Ale
ESF-IS	Imperial Stout
EPT-PA	Pale Ale

**Tabela 2 – Fator de Proteção Solar**

Extrato (1mg/mL)	FPS
CP	128,81 ± 0,35
EL-MS	44,12 ± 0,12
EL-IPA	23,53 ± 0,07
ESF-IS	36,25 ± 0,09
EPT-PA	25,07 ± 0,09

**Tabela 3 – Capacidade de Absorção UV**

Comprimento de onda (nm)	CP	EL-MS	EL-IPA	ESF-IS	EPT-PA
200	SD	SD	SD	SD	SD
250	50,00 ± 0,26	94,17 ± 0,29	73,27 ± 0,84	91,10 ± 0,36	70,00 ± 0,30
300	175,77 ± 1,37	65,85 ± 0,21	34,50 ± 1,04	55,90 ± 0,26	36,70 ± 0,20
350	140,50 ± 1,15	29,53 ± 0,06	11,43 ± 0,12	25,87 ± 0,23	12,43 ± 0,32
400	2,30 ± 0,17	15,07 ± 0,06	2,63 ± 0,15	11,40 ± 0,10	3,40 ± 0,10
450	0,23 ± 0,06	8,73 ± 0,06	1,23 ± 0,15	6,20 ± 0,26	1,49 ± 0,54

SD- semidados

### Conclusão

Em suma, os extratos de cervejas artesanais apresentam potencial de proteção contra as radiações UV, podendo, assim, ser ponderada a incorporação em protetores solares comerciais em combinação com outros compostos potencializando o FPS da formulação. Contudo, são necessários estudos de estabilidade e de segurança destes extratos.

### Referências Bibliográficas

1WHO. Ultraviolet radiation [Internet]. World Health Organization. 2022. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ultraviolet-radiation> [2023].

2García-GT, González, Fotoprotección SolarCosmetDermatol. 2009;186-82. /3 Cereja P, Pereira DV, Giliberto AMR, Pucoli L, Tavares A, Marins P, Di, et al. New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. Cosmetics. 2021;18:14. /4 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102746/>

5Kubovs, S., Neskak, T. A., & Zou, P. M. (2023). Sunscreens and Photoprotective. SkinPharm. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102746/>

6Marraco JB, Marañón R, Wang SQ, Lin MH. Sunscreens and pigments. Arch Clin Dermatol. 2013;9(4):502-7. The Commission of the European Communities. COMMISSION RECOMMENDATION of 22 September 2006 on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto. Off J Eur Union [Internet]. 2006;29:43. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0436&from=doc>

8Przybyla S, Imano MSB, Naselli H, Kuttaj A, Krasnowski P. Agilent study on sun protection factor of plant extracts. An observational study. Asian J Pharm Clin Res. 2018;11(06):71-75. /9 hash JE. Humansafety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. Dermatol Clin. 2006;24(3):35-51

161

## Apêndice VI

Palestra no âmbito do Ciclo de Seminários em Farmácia.





Poster 35

## Antioxidant profile of Portuguese and Spanish craft beers

 Maria João Pereira <sup>1\*</sup>, Diana Santos <sup>1</sup>, Cláudia Pinho <sup>2</sup> and Ana Isabel Oliveira <sup>2</sup>
<sup>1</sup> ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal

<sup>2</sup> LAQV/ REQUIMTE, ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal

\* Correspondence: psj@ess.ipp.pt

### Abstract

**Background:** The antioxidant potential of craft beer (CB) may be due to high quality of the raw materials (water, malt, hop and yeast) and traditional techniques [1-4]. The scarcity of studies evaluating the antioxidant potential of CB highlights the relevance of this study. **Objective:** *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of aqueous extracts of Portuguese and Spanish CB. **Methods:** Experimental study using six CB with different styles: Milk Stout (EL-MS), India Pale Ale (EL-IPA, ALM-IPA), Imperial Stout (EME-IS), Oatmeal Stout (ALM-OS), Pilsner (EL-P), Munich Dunkell (B-MD) and two industrial beers, Pilsner (S-P) and Munich Dunkell (S-MD). The pH, acidity content (AC) and total phenolic compounds (TPC) were determined. The antioxidant capacity was assessed using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) assays, expressed in concentration for 50% activity inhibition (IC<sub>50</sub>). One-way ANOVA and Student's t-test were used for statistical analysis in GraphPad® Prism 8.0 software, with a significance level of 0.05. **Results:** The pH of the beers varied between 3.89±0.00-4.78±0.05 and AC between 0.13±0.01-0.44±0.01%. ALM-IPA had the highest TPC value (8.96±0.64mg gallic acid equivalents/g). IPA style presented the lower IC<sub>50</sub> values in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ALM-IPA with an IC<sub>50</sub>=23.54±1.53µg/mL, *p*<0.05) and ABTS (EL-IPA with an IC<sub>50</sub>=55.21±4.68µg/mL, *p*<0.05) assays. The industrial beers have lower TPC values compared to CB (same style, *p*<0.05), and lower capacity to neutralize the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ABTS radicals. For Omisore *et al.* (2005), samples with IC<sub>50</sub>>50µg/mL are classified as being moderately active, while samples with IC<sub>50</sub><50µg/mL have high antioxidant capacity. Also, the results for IPA style are in line with Breda *et al.* (2022), in which light-colored beers had better antioxidant profiles. However, according to Silva *et al.* (2022) the best antioxidant profiles were associated with dark beers. **Conclusions:** The samples showed antioxidant potential, but further tests should be carried out considering the complex underlying antioxidant mechanisms.

**Keywords:** craft beer; antioxidant activity; phenolic compounds

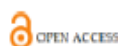
### Acknowledgments

This research received no external funding.

### References

1. DRE. Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro. Diário da República (2022), 1ª Série, 4-7.
2. Villacreses, S.; Blanco, C.A.; Caballero, I. Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Biosci* (2022), 45, 1-17.
3. Silva, S.; Oliveira, A.; Cruz, A.; Oliveira, R.; Almeida, R.; Pinho, C. Physicochemical properties and antioxidant activity Portuguese craft beers and raw materials. *Molecules* (2022), 27, 1-15.
4. Breda, C.; Barros, A.I.; Gouvímas, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *Int J Gastron Food Sci* (2022), 27, 1-7.
5. Omisore, N.O.A.; Adewunmi, C.O.; Iwalewa, E.O.; Ngadjui, B.T.; Adenowo, T.K.; Abegaz, B.M.; Ojewole, J.A.; Watchueng, J. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian J Med Biol Res* (2005), 38, 1087-1094.





Poster 34

## Potential impact of packaging type material in beer quality

 Diana Santos <sup>1,\*</sup>, Maria João Pereira <sup>1</sup>, Ana Isabel Oliveira <sup>1,2</sup> and Cláudia Pinho <sup>1,2</sup>
<sup>1</sup> ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal

<sup>2</sup> REQUIMTE/LAQV, ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal
\* Correspondence: [drs@ess.ipp.pt](mailto:drs@ess.ipp.pt)

### Abstract

**Background:** The materials in which beverages are packed are crucial to maintain quality, nutritional properties, and safety of the final product. In what beer concerns, and even under optimal storage conditions, its quality deteriorates as the product approaches the expiration date, regardless of the container type in which it is packed [1]. Therefore, a careful selection of packaging is imperative to maintain beer's integrity and quality, when tasted by the consumer. **Objective:** This work aims to discuss how the type of beer packaging influences the integrity and quality of this beverage during storage. **Methods:** A literature review was performed, using PubMed, b-on, and Web of Science databases. Articles related to the influence of packaging types on beer quality, in English, and published in the last 5 years were included. **Results:** Plastic bottles (PB) proved to be the least suitable type of packaging for long-term storage, as beer exhibits significant changes in volatile compounds, turbidity, color, bitterness intensity, and decrease in CO<sub>2</sub> content, unlike glass bottles (GB), aluminum cans (AC), and stainless steel kegs (KG), where these parameters remain constant [1-3]. Furthermore, Brown GB proved to be a more effective barrier against light compared to green GB and PB, as well as containing lower amounts of phthalates than beers in PB and AC [4,5]. AC was capable of retaining all organoleptic characteristics, showing a slight increase in bitterness after 10 months of storage [1]. However, beers stored in AC were characterized by higher aluminum contents compared to the products stored in glass bottles [6]. **Conclusions:** The beer packaging material plays a crucial role in its quality. Thus, GB, AC and KG, due to their barrier characteristics and protection against external factors, generally outperform PB in preserving the integrity and quality of beer.

**Keywords:** beer; packaging material; quality

### Acknowledgments

This research received no external funding.

### References

- Lorencová, E.; Salek, R.N.; Černošková, I.; Buňka, F. Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control* (2019), 106, 106706.
- Gagula, G.; Sarić, G.; Rezić, T.; Horvat, D.; Magdić, D. Changes in the Physicochemical Properties of Pale Lager Beer during Storage in Different Packaging Materials. *J Am Soc Brew Chem* (2023), 81(2), 351-356.
- Gagula, G.; Mastanjević, K.; Mastanjević, K.; Krstanović, V.; Horvat, D.; Magdić, D. The influence of packaging material on volatile compounds of pale lager beer. *Food Packag. Shelf Life* (2020), 24, 100496.
- Gabriel, P.; Dienstbier, M.; Fous, K.; Matoušková, D. Characterization of packaging ability to protect beer from light degradation and introduction of a new Packaging Riboflavin Index. *Kvasny Prumysl* (2022), 68(6), 679-685.
- Habschied, K.; Kartalović, B.; Lazić, D.; Krstanović, V.; Mastanjević, K. Survey on phthalates in beer packaged in aluminum cans, PET and glass bottles. *Fermentation* (2023), 9(2), 125.
- Gajek, M.; Wysocki, P.; Pawlaczek, A.; Sać, L.; Szyrkowska-Jozwik, M.I. The Elemental Profile of Beer Available on Polish Market: Analysis of the Potential Impact of Type of Packaging Material and Risk Assessment of Consumption. *Molecules* (2022), 27(9), 2962.

# Apêndice X

## Póster apresentado III 1H-TOXRUN International Congress 2024.



### Potential impact of packaging type material in beer quality

Diana Santos<sup>1</sup>; Maria João Pereira<sup>1</sup>; Ana Isabel Oliveira<sup>2</sup>; Cláudia Pinho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 – 072, Porto, Portugal

<sup>2</sup>REQUIMTE/LAQV, ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 – 072, Porto, Portugal

drs@ess.ipp.pt

#### INTRODUCTION

Beer is a beverage susceptible to chemical changes, which can result in undesirable alterations in its intrinsic characteristics, namely, antioxidant and organoleptic properties, during storage<sup>1-3</sup>. The type of packaging in which beer is stored plays an active role in preserving its quality, with beer usually being stored in<sup>1-3</sup>:



Each of the packages mentioned has advantages and disadvantages, which is why a careful selection of the packaging becomes essential so that the beer maintains its integrity and quality when tasting by the consumer.

#### OBJECTIVE

✓ Discuss how the type of beer packaging influences the integrity and quality of the beer during storage.

#### METHODS

- Databases: *PubMed, b-on and Web of Science*
- Keywords: "beer stability", "packaging type" and "physicochemical properties"
- Boolean operator: "AND"
- Language: English
- Time limit: last 5 years

#### RESULTS/DISCUSSION

- General Characteristics<sup>3-6</sup>**
- ➔ **Glass bottles:** inert to beer ingredients, impermeable to gases and vapors, maintain the freshness of the product for an extended period of time.
  - ➔ **Plastic bottles (ex polyethylene terephthalate – PET):** relatively good (non-airtight) barrier against the permeation of gases, aromatic compounds, and moisture.
  - ➔ **Metal packaging – Aluminum cans and Stainless steel kegs:** protection against ultraviolet light, corrosion-resistant, large label/advertising area, highly effective barrier to the effects of air, temperature, moisture, light, and microorganisms.

- ✓ The color of the packaging influences protection against light<sup>7</sup>;
- ✓ Brown glass bottles protect beer significantly better (absorb light)<sup>7</sup>;
- ✓ Brown bottles generally protect beer significantly better than green bottles<sup>7</sup>.
- ✓ Beer in PET bottles exhibit significant changes in volatile compounds (acetaldehyde, diacetyl, pentanedione, dimethylsulfide) after 1 month<sup>8</sup>;
- ✓ PET bottles are less suitable for long-term beer storage due to a significant increase in color values and an extended foam collapse time (higher melanoidin content)<sup>3</sup>;
- ✓ CO<sub>2</sub> levels decrease in PET bottles and remain constant in the other packaging<sup>3-3</sup>;
- ✓ PET bottles exhibit the greatest changes in turbidity, color, dissolved oxygen, and bitterness intensity<sup>5</sup>;
- ✓ High variability of foam stability in PET bottles<sup>5</sup>;
- ✓ Beers bottled in PET exhibited elevated levels of diisobutyl phthalate, dibutylphthalate, and bis(2-ethylhexyl)phthalate<sup>8</sup>.
- ✓ Glass bottles better preserve organoleptic characteristics for up to 6 months<sup>1</sup>;
- ✓ Greater colloidal stability in glass bottles<sup>2</sup>;
- ✓ Foam stability slight decline in glass bottles<sup>2</sup>;
- ✓ Beer in glass bottles contains the lowest amounts of phthalates<sup>8</sup>;
- ✓ Beer in glass bottles is characterized by a higher sodium content<sup>9</sup>;
- ✓ Glass bottles had higher antioxidant activity according to DPPH assay<sup>10</sup>.
- ✓ Aluminum cans and stainless-steel kegs maintain all organoleptic characteristics after six months, while PET and glass bottles exhibit negative sensory properties<sup>1</sup>;
- ✓ Aluminum cans are more susceptible to the volatilization of beer esters<sup>4</sup>;
- ✓ Uniform foam stability in cans and kegs<sup>5</sup>;
- ✓ Beers in aluminum cans showed elevated levels only of bis(2-ethylhexyl) phthalate<sup>8</sup>;
- ✓ Beer in aluminum cans has higher levels of aluminum, manganese, and copper<sup>9</sup>.

#### CONCLUSIONS

In summary, beer packaging plays a crucial role in the quality of the beer. Thus, although there is no ideal packaging for beer storage, and some results are contradictory regarding the sensory characteristics of beers stored in different types of packaging, it is observed that metal containers and glass bottles, due to their barrier and protection characteristics against external factors, generally outperform plastic bottles in preserving the integrity and quality of the beverage.

#### REFERENCES

1. De Lima, A. C., Assaf, M., & Braga, R. (2023). Microbiological evaluation of the arrangement of beer in aluminum cans and glass bottles during their storage process by means of SPME-GC/MS and real-time analysis. *Molecules*, 28(28), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules28020114>
2. Gagka, G., Mastzanić, K., Mastzanić, K., Kozanić, V., Horvat, D., & Magić, D. (2020). The influence of packaging material and temperature on the stability of beer. *Food Packaging and Shelf Life*, 24(10), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodpak.2020.100496>
3. Lorencovi, E., Sina, R. N., Đorđević, L., & Bakić, F. (2019). Evaluation of force-carbonated Czech type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control*, 106, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcon.2019.106706>
4. Froment, K., Ojapara, J. M., Saha, D., Van Buren, C., & Pham, J. E. (2023). Characterizing the impact of package type on beer stability. *ACS Food Science & Technology*, 3, 616-625. <https://doi.org/10.1021/acscfoodscitech.2c00255>
5. Gagka, G., Sina, G., Ristić, T., Horvat, D., & Magić, D. (2022). Changes in the physicochemical properties of pale lager beer during storage in different packaging materials. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 80(2), 253-258. <https://doi.org/10.1080/03614702.2022.2068318>
6. Marsh, K., & Burgess, B. (2007). Food packaging: risks, materials, and environmental issues. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 229-255. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.082006.100306>
7. Kabanov, P., Desobry, M., Fouz, K., & Matouk, D. (2022). Characterization of packaging ability to protect beer from light degradation and its effect on beer packaging stability index. *Food Packaging and Shelf Life*, 48, 679-685. <https://doi.org/10.1016/j.foodpak.2022.100879>
8. Hatoschek, K., Kartalović, B., Lazić, D., Krstović, V., & Mastzanić, K. (2023). Survey on phthalates in beer packaged in aluminum cans, PET and glass bottles. *Food Control*, 142, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcon.2023.109525>
9. Cigan, M., Wyszczek, A., Szał, S., & Wyszczek, A. (2022). The effect of different beer packaging materials on the stability of beer. *Food Control*, 132, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcon.2022.109525>
10. Brata, M. M., Brijunić, S., Pažec, A., & Gregorić, P. (2023). Influence of packaging material on polyphenol content and antioxidant activity in some commercial beers. *Processes*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.3390/proc11010011>