



Avaliação da atividade antioxidante de maltes, lúpulos e cervejas portuguesas

Daniela Lopes Araújo

07/2025





Avaliação da atividade antioxidante de maltes, lúpulos e cervejas portuguesas

Autor

Daniela Lopes Araújo

Orientadores

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

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

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



Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho pela dedicação, disponibilidade, sensibilidade, suporte e conhecimentos transmitidos que foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação, bem como para o meu crescimento académico.

Agradeço também à Professora Doutora Ana Isabel de Freitas Tavares de Oliveira, enquanto orientadora, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço à minha família, especialmente aos meus pais pelo apoio constante, pela compreensão e pela motivação, que foram essenciais para a conclusão desta etapa.



Resumo

Introdução: A cerveja é uma bebida consumida mundialmente, contendo malte e lúpulo com atividades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante. **Objetivo:** Discutir informação quanto à atividade antioxidante dos maltes, e avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante de cervejas artesanais e industriais portuguesas e matérias-primas. **Métodos:** A 1ª parte consistiu numa revisão clássica com discussão da atividade antioxidante de maltes, recorrendo às bases de dados PubMed® e Scopus®, utilizando palavras-chave como “malt” e “antioxidant activity”. Incluiu-se revisões e estudos *in vitro*, escritos em inglês e português, sem limite temporal. A 2ª parte consistiu num estudo experimental com avaliação, *in vitro*, da atividade antioxidante, pelo ensaio do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH); ensaio de neutralização do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), e atividade quelante de metais (MCA), de extratos aquosos e hidroalcoólicos, de malte (Chocolate, Munich type I, Vienna), lúpulo (Citra, Mosaic, Saaz), de cervejas artesanais (IS-N e BP-N) e uma industrial (SB-S). **Resultados:** O lúpulo apresentou melhores resultados, com valores de $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ (ex.: $7,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, extrato hidroalcoólico, DPPH). Apesar da baixa atividade antioxidante demonstrada, destaca-se a cerveja IS-N. No geral, as amostras hidroalcoólicas demonstraram um maior potencial antioxidante. **Conclusão:** As cervejas constituem uma fonte de antioxidantes naturais, cuja composição apresenta variações dependendo da produção e matérias-primas.

Palavras-chave: Cerveja Artesanal; Cerveja Industrial; Malte; Lúpulo; Atividade Antioxidante



Abstract

Introduction: Beer is a beverage consumed worldwide, containing malt and hops with biological activities, namely antioxidant activity. **Objective:** To discuss information on the antioxidant activity of malts, and to evaluate, *in vitro*, the antioxidant capacity of Portuguese craft and industrial beers and raw materials. **Methods:** The 1st part consisted of a classic review with discussion of the antioxidant activity of malts, using the PubMed® and Scopus® databases, using keywords such as "malt" and "antioxidant activity". Reviews and *in vitro studies* written in English and Portuguese were included, with no time limit. The 2nd part consisted of an experimental study with *in vitro* evaluation of the antioxidant activity, by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid neutralization assay), and metal chelating activity (MCA), of aqueous and hydroalcoholic extracts, malt (Chocolate, Munich type I, Vienna), hops (Citra, Mosaic, Saaz), craft beers (IS-N and BP-N) and an industrial (SB-S). **Results:** Hops showed better results, with $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ values (e.g., $7.4 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$, hydroalcoholic extract, DPPH). Despite the low antioxidant activity demonstrated, IS-N beer stands out. Overall, the hydroalcoholic samples demonstrated a higher antioxidant potential. **Conclusion:** Beers are a source of natural antioxidants, whose composition varies depending on production and raw materials.

Keywords: Craft Beer; Industrial Beer; Malt; Hops; Antioxidant Activity



Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Índice de Figuras.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Consumo e mercado da cerveja.....	2
1.2. Composição da cerveja.....	2
1.3. Etapas de produção da cerveja.....	4
1.4. Estilos de cerveja.....	5
1.5. Atividades biológicas da cerveja artesanal, matérias-primas e compostos ativos.....	6
1.6. Stress oxidativo e atividade antioxidante.....	8
1.6.1. Ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidazil (DPPH).....	9
1.6.2. Ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	9
1.6.3. Ensaio da atividade quelante de metais (MCA).....	10
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1. Parte I – Atividade antioxidante em maltes de cerveja: Revisão da literatura.....	13
3.1.1. Metodologia da Revisão.....	13
3.2. Parte II – Avaliação, <i>in vitro</i> , da atividade antioxidante em cervejas, maltes e lúpulos.....	13
3.2.1. Tipo de estudo, duração e local de realização.....	13
3.2.2. Reagentes.....	13
3.2.3. Equipamentos.....	14



3.2.4.	Preparação das amostras: cervejas artesanais e industriais.....	14
3.2.5.	Matérias-primas da cerveja: malte e lúpulo.....	15
3.2.6.	Preparação da solução aquosa de malte e lúpulo.....	15
3.2.7.	Preparação da solução hidroalcoólica de malte e lúpulo	16
3.2.8.	Ensaio antioxidante: 2,2-difenil-1-picrilhidazil (DPPH).....	16
3.2.9.	Ensaio antioxidante: atividade quelante de metais (MCA).....	16
3.2.10.	Ensaio antioxidante: 2,2'-azino-bis(ácido3-etilbenzotiazolina-6-sulfórico) (ABTS)	17
3.2.11.	Análise estatística	17
4.	Resultados e Discussão.....	18
4.1.	Parte I – Atividade antioxidante em maltes de cerveja: Revisão da literatura.....	18
4.1.1.	Malte: definição e processo de produção	18
4.1.2.	Tipos de malte	21
4.1.3.	Composição química do malte e atividade antioxidante.....	22
4.1.4.	Reação de <i>Maillard</i> em maltes.....	23
4.1.5.	Atividade antioxidante em maltes	24
4.1.6.	Aplicabilidade dos maltes na estabilidade da cerveja	27
4.2.	Parte II – Avaliação, <i>in vitro</i> , da atividade antioxidante em cervejas, maltes e lúpulos	28
4.2.1.	Atividade antioxidante das matérias-primas.....	28
4.2.2.	Atividade antioxidante das cervejas.....	33
5.	Conclusão	36
	Referências Bibliográficas	38



Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

AAE	Equivalente de ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS ⁺	Radical catiónico ABTS
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CUPRAC	Capacidade antioxidante de redução cúprica
d.m.	Matéria seca
dH ₂ O	Água destilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FRAP	Poder antioxidante por redução do ião férrico
FW	Peso fresco
HAT	Transferência de átomos de hidrogénio
IC ₅₀	Concentração inibitória média
MCA	Atividade quelante de metais
ORAC	Capacidade de absorção de radicais livres do oxigénio
PBS	Tampão fosfato-salino
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SET	Transferência de eletrão único
TE	Equivalentes de Trolox
TPC	Teor de fenólicos totais
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
US\$	Dólares americanos



Índice de Tabelas

Tabela 1. Cervejas artesanais e industriais no estudo (tipo, codificação, estilo, teor alcoólico e país).....	14
Tabela 2. Matérias-Primas utilizadas no estudo (denominação, tipo de malte, coloração, sabor, amargor e aroma).....	15
Tabela 3. Atividade antioxidante das amostras aquosas e hidroalcoólicas do malte.....	28
Tabela 4. Atividade antioxidante das amostras aquosas e etanólicas do lúpulo.....	31
Tabela 5. Atividade antioxidante das cervejas artesanais e industriais.....	34



Índice de Figuras

Figura 1. Inflorescências femininas do lúpulo (A); resina das inflorescências do lúpulo (B); estrutura química do xanthohumol e isoxanthohumol (C).....	3
Figura 2. Esquema do processo de produção da cerveja.....	4
Figura 3. Estilos da cerveja artesanal: Ale e Lager.....	6
Figura 4. Mecanismos de neutralização do DPPH por um antioxidante (AH).	9
Figura 5. Variação e cor no ensaio ABTS (a); Esquema de reação envolvido no ensaio de atividade de neutralização de radicais catiónicos ABTS ⁺ (b).....	10
Figura 6. Estrutura química da ferrozina como um agente quelante de metais	11
Figura 7. Esquema do processo de maltagem	19



1. Introdução

A indústria cervejeira existe há muitos anos e é responsável pela produção de uma das bebidas mais consumidas a nível mundial (De Simone *et al.*, 2021; Koller & Perkins, 2022). Nas últimas décadas, devido ao aumento do mercado da cerveja, observou-se um enorme desenvolvimento e consumo de cerveja artesanal (Koller & Perkins, 2022). O início das cervejas artesanais ocorreu em meados da década de 1960 nos Estados Unidos da América (EUA) e progrediu ao longo dos anos (Baiano, 2021).

Como outras bebidas alcoólicas, a cerveja é vista com cautela pela comunidade médica. No entanto, semelhante a outros produtos fermentados, esta bebida pode ter potenciais benefícios para a saúde e cervejas sem álcool podem ser facilmente produzidas (Zugravu *et al.*, 2023). Além disso, os ingredientes funcionais presentes na cerveja (por exemplo, os ácidos fenólicos, flavonóides, ácidos amargos como humulonas e lupulonas, vitaminas, minerais e hidratos de carbono complexos) podem mitigar os efeitos negativos do álcool presente nestes produtos (Zeng *et al.*, 2024).

A cerveja, de acordo com a legislação portuguesa, define-se como uma “bebida obtida por fermentação alcoólica, de um mosto preparado a partir de água potável e de malte de cereais, por ação de leveduras, ao qual são adicionadas flores de lúpulo e/ou seus derivados, cujos maltes de cereais deverão corresponder a, pelo menos, 50% em massa do total de matérias-primas fontes de açúcares empregues” (Portaria n.º 91/2022, 2022).

Relativamente à cerveja artesanal, é produzida em cervejeiras pequenas, independentes e tradicionais, sendo definida, segundo a *Brewers Association*, pela produção anual de 6 milhões de barris ou menos; e menos de 25% do seu capital pertence ou é controlado por um membro da indústria alcoólica (Baiano, 2021; *Brewers Association*, 2024). Apesar da definição de cerveja artesanal variar entre países, existem requisitos fundamentais que devem estar presentes neste produto, relativos especificamente à sua composição, uma vez que são utilizadas matérias-primas tradicionais e diversas outras matérias-primas não tradicionais como frutos, especiarias e plantas, por exemplo, utilizados em diversas proporções que conferem diferentes propriedades organolépticas. Além disso, também são utilizadas técnicas mais tradicionais o que permite, num todo, desenvolver uma ampla gama de cervejas (Bimbo *et al.*, 2023; Breda *et al.*, 2022; De Simone *et al.*, 2021; Tirado-Kulieva *et al.*, 2023).

Desta forma, para satisfazer a necessidade crescente da procura dos consumidores por um produto único, a indústria cervejeira encontra-se em constante inovação e diversificação, permitindo também desenvolver produtos com potenciais benefícios para a saúde (Bimbo *et al.*, 2023; De Simone *et al.*, 2021).



1.1. Consumo e mercado da cerveja

Em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde, a cerveja foi a segunda bebida mais consumida a nível mundial, apresentando 54,2% de consumo de álcool registado *per capita* em Portugal (World Health Organization, 2018).

O mercado da cerveja artesanal tem vindo a progredir com o decorrer dos anos. Em 2018 o seu mercado global foi avaliado em cerca de 108,91 mil milhões de dólares americanos (US\$) e prevê-se um aumento para 186,59 mil milhões US\$ até 2025, bem como uma representação acima de 15% do mercado total da cerveja. A literatura refere que os EUA e a Europa são os maiores produtores de cerveja artesanal, com 46% e 43% a nível mundial, respetivamente (Baiano, 2021).

Em Portugal, a cerveja artesanal foi consumida por 686 mil indivíduos, em 2021, dos quais se verificou um maior registo no sexo masculino (10,3%), comparativamente com o sexo feminino (6,6%) (Marktest Grupo, 2022). Nos anos de 2019 e 2021, Portugal contabilizou um total de 100 cervejeiras (Cerveja Artesanal Portuguesa – Lista de Cervejas Artesanais de Portugal, 2019).

1.2. Composição da cerveja

A cerveja é constituída por quatro ingredientes principais: água, malte, lúpulo e leveduras. A presença destes ingredientes aporta uma elevada importância para a composição da cerveja devido à diversidade de compostos presentes (Borşa *et al.*, 2022).

A água é o ingrediente principal da cerveja constituindo mais de 90% do produto final. Este ingrediente é essencial para o processo de produção, particularmente a fermentação. Desta forma é possível encontrar na cerveja iões catiónicos e aniónicos como cálcio, magnésio, sódio, potássio, sulfato, nitrato, fosfato, cloreto e silicato. É de realçar que a composição química da água origina diferentes estilos de cerveja, com diversos aromas e sabores (De Simone *et al.*, 2021; González-Salitre *et al.*, 2023; Jesús Callejo *et al.*, 2020).

Relativamente ao malte, este ingrediente constitui uma importante fonte de proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas e compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2022). A proteína encontra-se principalmente na forma de peptídeos e polipeptídeos apresentando um valor médio de 0,2-0,6 g/100 mL (Anderson *et al.*, 2019). Os aminoácidos presentes fornecem azoto, sendo responsáveis pela fermentação e sabor (Anderson *et al.*, 2019; Borşa *et al.*, 2022). Além disso, a cerveja é constituída por aproximadamente 3,3-4,4% de hidratos de carbono que incluem dextrinas (75-80%), monossacarídeos e oligossacarídeos (20-30%) e pentosanas (5-8%) (Anderson *et al.*, 2019). Também estão presentes as vitaminas do complexo B, nomeadamente, a vitamina B2 (riboflavina), a vitamina B3 (ácido nicotínico), a



vitamina B6 (piridoxina), a vitamina B9 (ácido fólico), e a vitamina B12 (cianocobalamina) (Puligundla *et al.*, 2020).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), em particular a flor da planta (Figura 1), é o ingrediente que se apresenta em menor quantidade. Contudo, é importante na cerveja, contribuindo para o amargor e aroma, através de α -ácidos (humulonas), β -ácidos (lupulonas) e compostos voláteis (octonato de metilo). Além disso, o lúpulo melhora a formação e estabilidade da espuma e possui atividade antibacteriana, protegendo a cerveja da deterioração por determinados microrganismos (De Simone *et al.*, 2021; González-Salitre *et al.*, 2023; Villacreces *et al.*, 2022). Compostos fenólicos e óleos essenciais, como hidrocarbonetos (mono e sesquiterpenos) e compostos que contêm oxigênio, denominados de terpenóides, como ésteres alifáticos, aldeídos, cetonas e álcoois superiores também podem ser encontrados no lúpulo e contribuem para diversas atividades biológicas e aromas (Anderson *et al.*, 2019; González-Salitre *et al.*, 2023; Humia *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos presentes na cerveja derivam principalmente do malte e lúpulo, cerca de 75% e 25% respectivamente, e são a principal fonte de antioxidantes da cerveja (Humia *et al.*, 2019). O ácido gálico, ácido vanílico, ácido ferúlico, xanthohumol, 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina são alguns exemplos de compostos fenólicos presentes na cerveja (González-Salitre *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022).

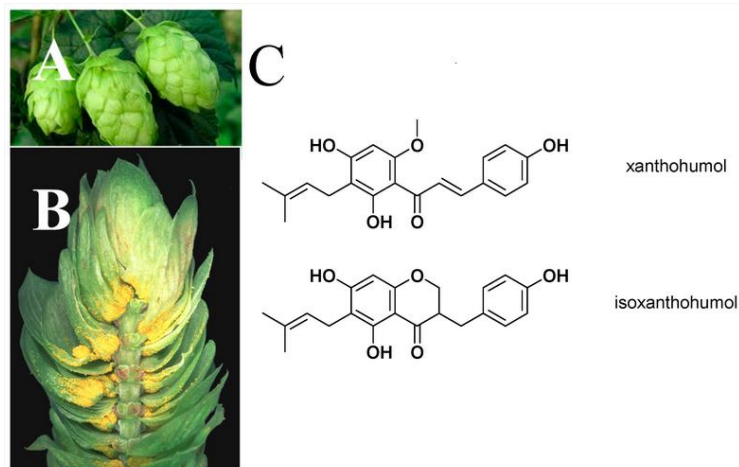


Figura 1. Inflorescências femininas do lúpulo (A); resina das inflorescências do lúpulo (B); estrutura química do xanthohumol e isoxanthohumol (C) (Adaptado de Liu *et al.*, 2015).

Por fim, a levedura, responsável por converter o açúcar em etanol e dióxido de carbono (CO₂), também produz compostos secundários como álcoois superiores (por exemplo, propanol e isobutanol), ésteres (por exemplo, acetato de etilo, acetato de isobutilo), aldeídos, compostos sulfurados, cetonas e ácidos



orgânicos (por exemplo, ácido láctico e ácido acético) que contribuem para as características sensoriais da cerveja (Borşa *et al.*, 2022; González-Salitre *et al.*, 2023; Villacreces *et al.*, 2022).

1.3. Etapas de produção da cerveja

O processo de produção da cerveja é realizado em diversas etapas (Figura 2) com recurso aos ingredientes principais (água, malte, lúpulo e leveduras) e também a outros ingredientes que permitem obter um produto diversificado (Borşa *et al.*, 2022).

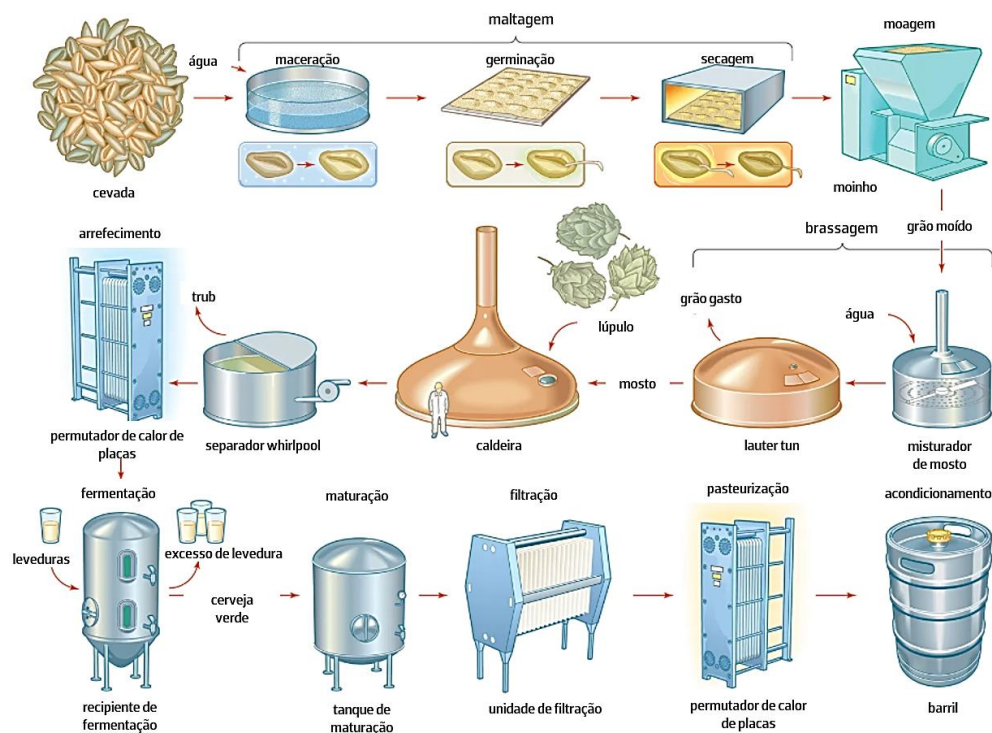


Figura 2. Esquema do processo de produção da cerveja (Adaptado de Young Thomas, 2024).

O processo de maltagem é a primeira etapa na produção de cerveja. A maltagem caracteriza-se pela germinação controlada de cereais (como por exemplo, cevada, trigo, arroz, milho, aveia, centeio) (Villacreces *et al.*, 2022), a uma temperatura reduzida, permitindo reduzir as perdas de hidratos de carbono, o crescimento de radículas e favorecer a germinação dos grãos (Humia *et al.*, 2019). A germinação desencadeia a produção de enzimas hidrolíticas, como enzimas que hidrolisam o amido (α -amilase e β -amilase), as paredes celulares (β -glucanases) e proteínas (carboxipeptidases e endopeptidases) (Vivian *et al.*, 2016). De seguida, de forma a interromper a atividade enzimática, os grãos são secos a temperaturas que podem variar entre os 85°C e acima dos 200°C, parâmetro este que influencia o sabor e a cor do malte (Vivian *et al.*, 2016).



Posteriormente, ocorre a moagem dos grãos, com recurso a um moinho, permitindo obter um produto totalmente triturado, facilitando a ação enzimática. Ao produto triturado, é adicionada água, que passa por um processo de aquecimento (podendo ser submetido a diferentes temperaturas), levando à formação do mosto. O mosto é constituído por pequenas moléculas de açúcar, como maltose e glicose, e também apresenta proteínas solúveis, péptidos e aminoácidos (Humia *et al.*, 2019; Vivian *et al.*, 2016).

Após a produção do mosto, este é submetido à temperatura de ebulição e é realizada a adição do lúpulo e/ou outras matérias-primas, permitindo a esterilização do mosto, inativação enzimática, concentração do mosto através da evaporação da água e coagulação de proteínas. Além disso, este processo possibilita a extração de humulonas e lupulonas, que influenciam o amargor e sabor da cerveja (Vivian *et al.*, 2016). De seguida, é realizada a filtragem de forma a extrair todas as partículas que se encontram em suspensão como, material vegetal, proteínas e detritos (Humia *et al.*, 2019).

No processo de fermentação, é adicionada a levedura ao mosto e os açúcares presentes são convertidos em álcool e CO₂ (Humia *et al.*, 2019; Vivian *et al.*, 2016). Esta fase é também influenciada pela temperatura, pH, agitação, concentração dos açúcares e outros nutrientes, contaminantes e taxa de inoculação da levedura (Vivian *et al.*, 2016).

Concluída a fermentação, inicia-se a maturação, na qual a cerveja é armazenada a temperaturas reduzidas, que dependem do tipo de cerveja a produzir, por várias semanas (Humia *et al.*, 2019). Nesta etapa do processo, as leveduras restantes promovem uma elevada produção de CO₂ e a eliminação química de compostos indesejáveis (diacetil, acetaldeído e compostos de enxofre). A clarificação da cerveja realiza-se nesta fase através da sedimentação das células da levedura (Vivian *et al.*, 2016). Por fim, a cerveja é acondicionada de forma a preservar o seu sabor (Ciont *et al.*, 2022).

É de realçar que existem algumas diferenças entre a produção de cervejas industriais e artesanais, nomeadamente a filtração e pasteurização (que não se verifica na maioria das cervejas artesanais) realizada no final do processo das cervejas industriais, de forma a remover a levedura e esterilizar o produto antes do acondicionamento (Humia *et al.*, 2019; Rodhouse & Carbonero, 2019). Além disso, as cervejas artesanais recorrem a ingredientes de elevada qualidade tradicionais e não tradicionais e não utilizam aditivos químicos na sua produção, obtendo assim uma bebida de elevada qualidade (Villacreces *et al.*, 2022).

1.4. Estilos de cerveja

As cervejas diferenciam-se essencialmente pelo tipo de fermentação realizado na sua produção, podendo ser divididas em dois grandes grupos: Ale e Lager (Figura 3) (Vivian *et al.*, 2016). As cervejas Ale



são produzidas através de leveduras de fermentação alta, *Saccharomyces cerevisiae*, com temperaturas de fermentação a variar entre os 15°C e 25°C. Neste estilo de cerveja, as cepas de levedura tendem a flocular, reter o CO₂ e subir à superfície. Relativamente às cervejas Lager, estas são produzidas em fermentação baixa a variar entre os 5°C e 10°C, através da utilização da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces pastorianus*. Ao contrário do estilo Ale, estas não floculam e precipitam, mantendo-se na parte inferior (Breda *et al.*, 2022; Ciont *et al.*, 2022; González-Salitre *et al.*, 2023). Além disso, existem algumas diferenças verificadas no processo de maturação, uma vez que as Lagers são armazenadas a temperaturas inferiores às Ales (Ciont *et al.*, 2022).

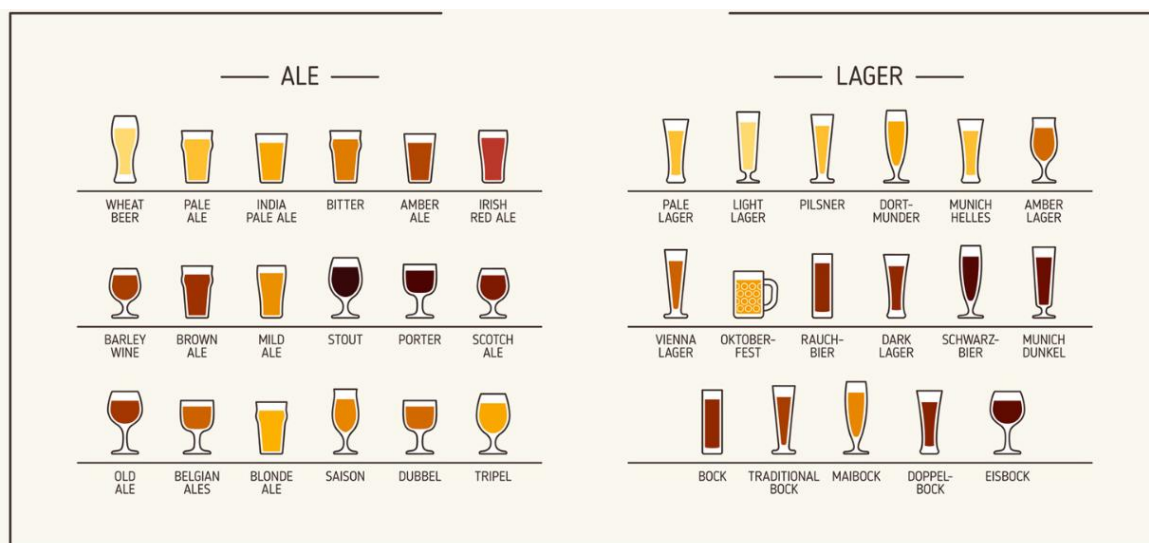


Figura 3. Estilos da cerveja artesanal: Ale e Lager (Do Fabrico Ao Consumo de Cerveja, 2020).

O tipo de fermentação influencia a diversidade de aromas e sabores. O estilo Ale apresenta uma ampla gama de aromas e sabores, sendo caracterizado por ser mais forte, com maior teor alcoólico e com um sabor mais frutado. A cerveja Lager, é mais leve e apresenta uma maior expressão dos cereais e lúpulos utilizados na sua produção (Cervejeiros de Portugal, 2024; Seo *et al.*, 2020).

1.5. Atividades biológicas da cerveja artesanal, matérias-primas e compostos ativos

A presença de determinados ingredientes na composição da cerveja artesanal favorece inúmeras atividades biológicas. Os compostos fenólicos, provenientes do lúpulo e do malte, possuem ação antioxidante favorecendo a estabilidade da cerveja, bem como vantagens para a saúde dos consumidores (Silva *et al.*, 2022).



O estudo realizado por Moura-Nunes *et al.* (2016), analisou o teor de fenólicos totais (TPC) e a capacidade antioxidante de cervejas comerciais de diferentes partes do mundo, concluindo que não existe uma diferença significativa entre os produtos. Por sua vez, no estudo realizado por Shopska *et al.* (2021), determinaram que existe uma relação entre a cor do malte e o seu teor de compostos fenólicos. No estudo de Wu *et al.* (2020), foi comparada a atividade antioxidante a anti-inflamatória de extratos de lúpulo com recurso a diferentes solventes (água e etanol a 55%, 75% e 95%) e relataram um maior potencial antioxidante e anti-inflamatório em extratos de lúpulo etanólico, em particular a 95%, comparativamente com os extratos aquosos.

Por sua vez, estudos realizados por Breda *et al.* (2022) e Silva *et al.* (2022), demonstraram que a capacidade antioxidante e o TPC das cervejas artesanais são superiores face às cervejas industriais. Também no seu estudo, Pereira *et al.* (2025) demonstraram que uma cerveja de estilo India Pale Ale (ALM-IPA) apresentou o segundo melhor valor de TPC ($8,96 \pm 0,64$ mg of GAE/g) e uma atividade antioxidante promissora através do ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (concentração inibitória média (IC₅₀) = $55,21 \pm 4,68$ µg/mL), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (IC₅₀ = $23,54 \pm 1,53$ µg/mL) e atividade quelante de metais (MCA) ($53,74 \pm 1,27$ µmol TE/g) (Pereira *et al.*, 2025). Uma vez que as cervejas artesanais são produzidas recorrendo a diferentes matérias-primas e processos de fabrico, o que confere autenticidade, originalidade e inovação, a presença dos compostos bioativos pode variar entre os produtos finais, podendo existir uma ampla gama de compostos fenólicos e variações na atividade antioxidante (Breda *et al.*, 2022).

Um estudo clínico recente avaliou o efeito a longo prazo do consumo diário moderado de cerveja (com e sem álcool) na saúde cardiovascular em mulheres na pós-menopausa. Concluiu-se que o consumo moderado melhorou o perfil lipídico nas mulheres em estudo, embora os seus efeitos na prevenção de alterações cardiometabólicas necessitem ainda de mais estudos (Trius-Soler *et al.*, 2023).

Num outro ensaio clínico, 22 homens saudáveis foram recrutados para consumir 330 mL de cerveja sem álcool ou cerveja com álcool (5,2% V/V) durante um período de 4 semanas, de forma a avaliar a microbiota intestinal. Observou-se que o consumo de cerveja com e sem álcool aumentou a diversidade da microbiota intestinal, o que foi associado a resultados positivos para a saúde (Marques C. *et al.*, 2022).

Sabe-se ainda, que os compostos bioativos do lúpulo conferem diversas atividades biológicas, entre elas, a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena e antibacteriana. Estas atividades devem-se à presença de compostos, como o xanthohumol, 6-prenilnaringenina, 8-prenilnaringenina e isoxanthohumol, por exemplo (González-Salitre *et al.*, 2023; Humia *et al.*, 2019). O estudo desenvolvido por Caban *et al.* (2022) demonstrou que os extratos de lúpulo inibiram a angiogénese, a invasão e a



migração de células de adenocarcinoma colorretal. Li *et al.* (2023) identificaram os componentes do lúpulo com maior contribuição para a atividade antibacteriana, destacando a colupulona e lupulona como os principais contribuintes por esta atividade biológica. Por sua vez, o estudo de Bartmańska *et al.* (2018) evidenciou que os extratos de lúpulo apresentaram atividade antimicrobiana, incluindo antifúngica e antibacteriana, mediada por flavonoides como a 8-prenilnaringenina e α,β -di-hidroxi-xantohumol.

Além disso, também é relatado na literatura a capacidade hepatoprotetora do xanthohumol. O estudo realizado por Pinto *et al.* (2012) através de um ensaio *in vivo* em ratos, demonstrou que o xanthohumol (flavonóide presente no lúpulo) preveniu o dano hepático induzido pelo tetracloreto de carbono (agente hepatotóxico) devido à sua capacidade antioxidante, eficiência na inibição da peroxidação lipídica e na proteção contra a degradação de enzimas antioxidantes. Outro estudo, *in vitro*, realizado por Plazar *et al.* (2007) verificou que o xanthohumol protegeu as células de hepatoma humano contra a genotoxicidade induzida por agentes genotóxicos da ação indireta, e de agentes indutores de espécies reativas de oxigênio (ROS).

1.6. Stress oxidativo e atividade antioxidante

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, como, por exemplo, os ROS, nomeadamente o radical superóxido, radical hidroxilo e H_2O_2 (Adjimani & Asare, 2015; Baliyan *et al.*, 2022). As ROS podem ser geradas por fatores externos ou internos e, geralmente, são eliminadas pela presença de antioxidantes. Contudo, se ocorrer a superprodução de ROS ou se a capacidade de neutralização do sistema antioxidante estiver em desequilíbrio, pode favorecer o stress oxidativo e consequentemente o dano de diversas biomoléculas como, proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico (ADN), por exemplo (Adjimani & Asare, 2015). Desta forma, os compostos antioxidantes apresentam um papel crucial na neutralização da produção de radicais, reduzindo e prevenindo possíveis danos causados. Estes compostos (ex.: ácidos fenólicos e flavonóides) podem ser encontrados em plantas e outros produtos naturais (Baliyan *et al.*, 2022).

A determinação da capacidade antioxidante pode ser realizada através de mecanismos diferentes: transferência de átomos de hidrogénio (HAT), técnica de transferência de eletrão único (SET) ou uma combinação de ambos (Liang & Kitts, 2014).

A reação HAT baseia-se na transferência de um átomo de hidrogénio, o qual inclui um próton e um eletrão. Neste mecanismo, o radical livre remove um átomo de hidrogénio do antioxidante e, desta forma, o antioxidante torna-se num radical neutralizado. O ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-



6-sulfónico) (ABTS) e a capacidade de absorção de radicais de oxigénio são exemplos de ensaios fundamentados em HAT (Rana *et al.*, 2024).

A reação SET está relacionada com a transferência de um único eletrão. Este mecanismo avalia a capacidade de um antioxidante transferir um eletrão para o radical livre, estabilizando-o. Após a transferência, o antioxidante torna-se um catião radical. O ensaio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) é um exemplo de ensaio baseado em SET (Liang & Kitts, 2014; Rana *et al.*, 2024).

1.6.1. Ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidazil (DPPH)

O método do DPPH é relativamente simples, altamente sensível, rápido e preciso e um dos métodos de determinação da atividade antioxidante mais utilizado. Este ensaio baseia-se na redução do radical DPPH, radical livre estável à base de nitrogénio, pelo antioxidante, através da transferência de um eletrão ou da cedência de um hidrogénio, provocando uma alteração da cor violeta para amarelo claro (Figura 4).

Desta forma, quando existem compostos antioxidantes na solução esta coloração perde intensidade ou desaparece. O radical violeta que restou na solução é medido com recurso a um espectrofotómetro UV-vis (entre 515–520 nm) de forma a determinar a atividade antioxidante da amostra em estudo (Adjimani & Asare, 2015; Sirivibulkovit *et al.*, 2018).

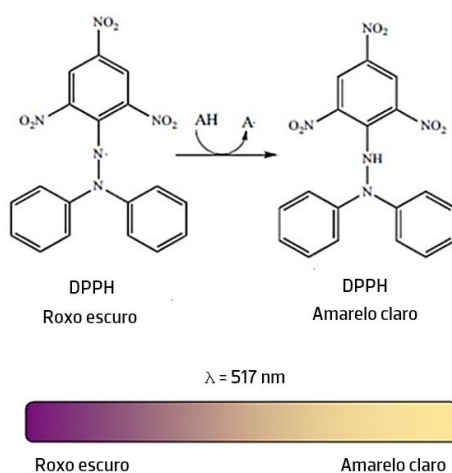


Figura 4. Mecanismos de neutralização do DPPH por um antioxidante (AH) (Adaptado de Munteanu & Apetrei, 2021).

1.6.2. Ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

O ensaio ABTS, também designado por capacidade antioxidante equivalente ao ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), foi desenvolvido pela primeira vez por Miller *et al.*



(1993), sendo um método simples e adequado para medir a capacidade antioxidante total. O ensaio ABTS é um método utilizado para medir a capacidade antioxidante das amostras em estudo, com base na capacidade de neutralizar o radical catiónico ABTS ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) através da transferência de eletrões (Figura 5). Além disso, o radical ABTS é solúvel em água e solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Munteanu & Apetrei, 2021). O $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pode ser gerado a partir do reagente ABTS na presença de fortes agentes oxidantes. O $\text{ABTS}^{\cdot+}$ apresenta uma cor azul-esverdeada com absorção máxima a 734 nm. Quando o $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é neutralizado ocorre a diminuição da intensidade da sua cor e conseqüentemente na redução da absorvância (Munteanu & Apetrei, 2021).

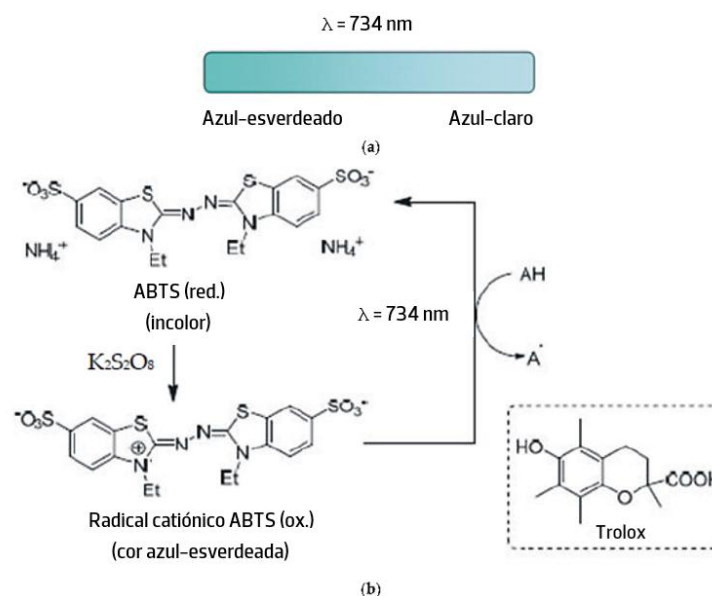


Figura 5. Variação e cor no ensaio ABTS (a); Esquema de reação envolvido no ensaio de atividade de neutralização de radicais catiónicos $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (b) (Adaptado de Munteanu & Apetrei, 2021).

1.6.3. Ensaio da atividade quelante de metais (MCA)

Uma das estratégias para estimar a capacidade de quelação é medindo os iões de ferro livres, usando um agente quelante 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-*p,p'*-hidrato de sal monossódico de ácido dissulfónico (também conhecido por ferrozina) (Figura 6), através da formação de um complexo facilmente detectável por análise de espectroscopia.

Assim, o ensaio MCA, ou ensaio da ferrozina, avalia a capacidade do agente antioxidante quelar o ião ferroso (Fe^{2+}). A presença do antioxidante com capacidade quelante reduz a quantidade de Fe^{2+} disponível para se ligar à ferrozina, impedindo a formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} e,



consequentemente, resultando na redução da cor rosa decorrente dessa ligação (Adjimani & Asare, 2015; Allen & Cornforth, 2009).

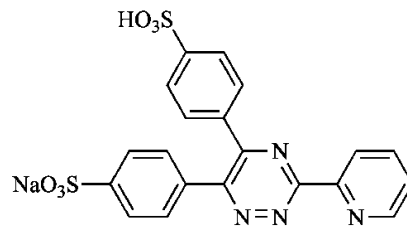


Figura 6. Estrutura química da ferrozina como um agente quelante de metais (Gulcin & Alwaseel, 2022).



2. Objetivos

Como referido anteriormente, a cerveja e as suas matérias-primas contêm uma diversidade de compostos fenólicos, vitaminas do complexo B, minerais (ex.: selénio, silício e potássio), fibras solúveis e microorganismos. Sabe-se que um consumo baixo ou moderado de cerveja, com ou sem álcool, tem demonstrado efeitos positivos na saúde, por exemplo estimulando o desenvolvimento de uma microbiota saudável. Desta forma, e face ao consumo atual desta bebida pela população em todo o mundo, onde se inclui a população portuguesa, é cada vez mais importante estudar os benefícios da cerveja, nomeadamente a atividade antioxidante do malte e lúpulo, assim como do produto final. Os antioxidantes estão diretamente envolvidos na proteção do organismo contra os efeitos nocivos dos radicais livres, e que podem estar associados ao envelhecimento precoce, a doenças cardiovasculares, a doenças neurodegenerativas, e inflamação crónica. Tendo em conta estes pressupostos, o trabalho apresenta como objetivos:

- Discutir, através de uma revisão da literatura, a atividade antioxidante dos maltes, com ênfase na sua composição química, nos fatores que influenciam esta atividade e nos métodos utilizados.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, de extratos aquosos e hidroalcoólicos de cervejas artesanais e industriais portuguesas, assim como das suas matérias-primas (malte e lúpulo), recorrendo aos ensaios do DPPH, ABTS e MCA.



3. Materiais e Métodos

3.1. Parte I – Atividade antioxidante em maltes de cerveja: Revisão da literatura

3.1.1. Metodologia da Revisão

A presente revisão narrativa foi realizada entre abril e junho de 2025, utilizando as bases de dados PubMed® e Scopus®, com as palavras-chave “malt”, “antioxidant activity”, “malting process”, “beer”, “phenolic compound” e “melanoidins”, utilizadas isoladamente ou combinadas com o operador “AND”.

Os critérios de inclusão foram revisões e estudos experimentais *in vitro*, escritos em inglês e português, sem limites temporais estabelecidos.

Foram utilizados artigos que estudaram a atividade antioxidante do malte, *in vitro*, enquanto matéria-prima das cervejas artesanais e industriais, assim como a influência das várias fases do processo de fabrico na atividade antioxidante.

3.2. Parte II – Avaliação, *in vitro*, da atividade antioxidante em cervejas, maltes e lúpulos

3.2.1. Tipo de estudo, duração e local de realização

Estudo experimental realizado entre setembro de 2024 e fevereiro de 2025, nas instalações do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (E2S-P.Porto).

3.2.2. Reagentes

A quercetina e o DPPH foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA); o etanol absoluto foi obtido da Honeywell® (Seelze, Alemanha); o dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da empresa ThermoFisher® (Loughborough, Reino Unido); o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o sulfato ferroso foram obtidos da VWR® Chemicals (Ohion, EUA); a ferrozina e o ABTS foram obtidos da empresa ThermoFisher® (Kendal, Alemanha). O persulfato de potássio foi obtido da empresa Biochem Chemopharma® (ZA Cosne sur loire, França). Por sua vez, o tampão fosfato-salino (PBS), foi obtido da empresa Corning® (Manassas, EUA).



3.2.3. Equipamentos

O sonicador (Clifton SW12H[®], Alemanha), o evaporador rotativo (VWR, Ika RV8[®]), o liofilizador (LABCONCO FreeZone series[®], EUA), o moinho elétrico (Taurus Aromatic 150w, Espanha), a placa de agitação magnética (VWR 4x4 ALU HOT/STIR 230V ADR, EUA), o leitor de microplacas (Thermoscientific[®] MULTISKA FC, China) e o espectrofotómetro UV-vis (Modelo VWR UV-1600PC, China) foram utilizados no presente trabalho.

3.2.4. Preparação das amostras: cervejas artesanais e industriais

A seleção das cervejas artesanais e industriais foi realizada tendo em conta trabalho prévio da equipa de investigação, realizado com cervejas artesanais, de forma a dar continuidade ao mesmo. Como tal, foram utilizadas três cervejas (duas cervejas artesanais portuguesas e uma cerveja industrial portuguesa), de três estilos diferentes (Tabela 1). As cervejas artesanais selecionadas foram as que obtiveram melhores resultados (na proteção hepática) em trabalho prévio.

Tabela 1. Cervejas artesanais e industriais no estudo (tipo, codificação, estilo, teor alcoólico e país).

Tipo	Codificação	Cerveja artesanal vs. Industrial	Estilo da Cerveja	Teor alcoólico	País
Ale	BP-N	Cerveja Artesanal	Brown Porter	4,8%	Portugal
	IS-N	Cerveja Artesanal	Imperial Stout	8,5%	Portugal
	SB-S	Cerveja Industrial	Sweet Stout	5,0%	Portugal

A preparação das cervejas foi realizada através do método descrito por Censi *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2022). Inicialmente, homogeneizou-se o conteúdo de cada garrafa e, posteriormente realizou-se a sua desgaseificação por sonicação (Clifton SW12H[®]) durante 40 min a 35 kHz, à temperatura ambiente. A remoção do álcool foi feita no evaporador rotativo (VWR, Ika RV8[®]), com pressão reduzida e temperatura controlada (40°C). Após a sua remoção, as amostras das cervejas foram liofilizadas (LABCONCO FreeZone series[®]), e armazenadas a -80°C.

Para os ensaios realizados foram utilizadas duas amostras de cada cerveja: a) cerveja liofilizada solubilizada em água destilada (dH₂O), e b) cerveja liofilizada solubilizada numa mistura hidroalcoólica composta por dH₂O e etanol absoluto, na mesma proporção da cerveja original (4,8% (BP-N); 8,5% (IS-N); 5,0% (SB-S)).



3.2.5. Matérias-primas da cerveja: malte e lúpulo

As matérias-primas analisadas no decorrer do trabalho foram o malte e o lúpulo, as quais foram cedidas pelas respetivas marcas comerciais das cervejas artesanais em estudo. A seleção das matérias-primas (três maltes e três lúpulos) foi feita com base nas suas características organoléticas assim como, pelo facto de serem variedades muito utilizadas na produção de cerveja artesanal (Tabela 2).

Tabela 2. Matérias-Primas utilizadas no estudo (denominação, tipo de malte, coloração, sabor, amargor e aroma).

Matéria-prima	Denominação	Malte	Coloração	Sabor, amargor e aroma	Referências
Malte	Vienna	Base	Amarelo	Suave	(Casa Da Cerveja, 2024; Hop Breeding Company - Leading the Hop Research Industry, 2024)
	Munich Type I (Munich Light)	Base	Âmbar	Caramelo e ligeiramente fumado	
	Chocolate Rye	Especial	Castanho muito escuro	Café e cacau	
Lúpulo	Citra	-	-	Frutas cítricas e tropicais	2024)
	Saaz	-	-	Ligeiro e delicado a flores	
	Mosaic	-	-	Floral, tropical, frutado e terrosos	

3.2.6. Preparação da solução aquosa de malte e lúpulo

A preparação das amostras de malte realizou-se de acordo com o descrito por Censi *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2022). Resumidamente, o malte passou por um processo de moagem através de um moinho elétrico (Taurus Aromatic 150w) (30 segundos), pesando-se, de seguida, 25 g de cada malte a estudar. Posteriormente, foram adicionados 225 mL de dH₂O à amostra de malte e aquecido (Clifton SW12H®) a 45°C por 15 min. Após arrefecer, procedeu-se à filtração das amostras por gravidade. Por fim, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -80°C até à sua utilização.

Relativamente ao lúpulo, as amostras foram preparadas através do método descrito por Censi *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2022). O lúpulo passou pelo processo de moagem através do moinho elétrico (30 segundos), pesando-se 2,5 g dos diferentes lúpulos. Seguidamente, foram adicionados 100 mL de dH₂O fervente e permaneceu em ebulição por 30 min. Após arrefecimento, o conteúdo anterior foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e perpez-se o volume com dH₂O. A solução foi filtrada por



gravidade e posteriormente liofilizada e armazenada a -80°C . Os parâmetros de liofilização das amostras variaram entre 0,070 mBar a 0,200 mBar, enquanto a temperatura variou de -62°C a -58°C .

3.2.7. Preparação da solução hidroalcoólica de malte e lúpulo

A preparação das amostras de malte e lúpulo realizou-se de acordo com o descrito por Wu *et al.* (2020) com ligeiras alterações. As matérias-primas passaram por um processo de moagem através do moinho elétrico (30 segundos), pesando-se 1 g de cada amostra. Ao pó obtido adicionou-se etanol a 95% (V/V) e, de seguida, permaneceu sob agitação magnética (VWR 4x4 ALU HOT/STIR 230V ADR) a 400 rpm e temperatura ambiente, durante 30 min. Posteriormente, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo a 38°C . A solução foi liofilizada e armazenada a -80°C . Os parâmetros de liofilização das amostras foram os mesmos dos referidos anteriormente.

3.2.8. Ensaio antioxidante: 2,2-difenil-1-picrilhidazil (DPPH)

O ensaio do DPPH foi realizado de acordo com o descrito por Silva *et al.* (2022), com pequenas alterações. Resumidamente, numa placa de 96 poços foi adicionado 19,4 μL da amostra (malte, lúpulo ou cervejas) em diferentes concentrações (de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 175 μL de radical DPPH (100 μM). Como controlo positivo utilizou-se a quercetina. A absorvância foi medida a 520 nm com recurso do leitor de microplacas (Thermoscientific® MULTISKA FC). A atividade de neutralização do DPPH foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de DPPH (\%)} = \frac{(\text{Absorvância controlo} - \text{Absorvância amostra})}{\text{Absorvância controlo}} \times 100$$

Posteriormente, determinou-se o valor de IC_{50} expresso em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2.9. Ensaio antioxidante: atividade quelante de metais (MCA)

A determinação da MCA foi realizada de acordo com o descrito por Silva *et al.* (2022). Numa placa de 96 poços, adicionou-se 50 μL das amostras em diferentes concentrações (de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou controlo positivo (EDTA), 50 μL da solução de sulfato ferroso (0,15 mM) e 50 μL da solução de ferrozina (0,5 mM). Após a adição das soluções a cada poço, a placa foi agitada e permaneceu protegida da luz, à temperatura ambiente, durante 10 min. Após esse período foi medida a absorvância a 570 nm com recurso do leitor de microplacas. A capacidade quelante das amostras foi calculada e expressa em (%), com recurso à seguinte fórmula:



$$\text{Atividade quelante (\%)} = \frac{(\text{Absorvância controlo} - \text{Absorvância amostra})}{\text{Absorvância controlo}} \times 100$$

Posteriormente, determinou-se o valor de IC₅₀ expresso em µg/mL.

3.2.10. Ensaio antioxidante: 2,2'-azino-bis(ácido3-etilbenzotiazolina-6-sulfórico) (ABTS)

O ensaio de ABTS foi realizado em concordância com o descrito por Petrón *et al.* (2021) com ligeiras alterações. Inicialmente, preparou-se uma solução de ABTS (7 mM) e uma solução de persulfato de potássio (K₂O₈S₂) (2,25 mM) em dH₂O. Posteriormente, as soluções referidas anteriormente foram combinadas de forma a obter uma solução de ABTS⁺ e armazenada durante 12-16h à temperatura ambiente, protegida da luz. De seguida, o ABTS⁺ foi diluído em PBS e lida a absorvância a 734 nm de forma a obter um valor de 0,7 ± 0,05. De seguida, adicionou-se 1,8 mL do ABTS⁺ a 200 µL de amostra a diferentes concentrações (de 1 µg/mL a 1000 µg/mL). Após 30 minutos de incubação, a absorvância foi lida a 734 nm em espectrofotómetro UV-vis (Modelo VWR UV-1600PC). Como controlo utilizou-se o Trolox. A atividade de neutralização do ABTS⁺ foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de ABTS (\%)} = \frac{(\text{Absorvância controlo} - \text{Absorvância da amostra})}{\text{Absorvância controlo}} \times 100$$

O valor de IC₅₀ foi, posteriormente, determinado e expresso em µg/mL.

3.2.11. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada no software *GraphPad Prism*® 10.3.0. Os dados, obtidos em triplicado, foram apresentados como média ± desvio padrão. Recorreu-se à análise da variância simples (ANOVA) com o teste de comparações múltiplas de Sidak. As diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$.



4. Resultados e Discussão

4.1. Parte I – Atividade antioxidante em maltes de cerveja: Revisão da literatura

Com o decorrer dos anos, verificou-se um crescente interesse por alimentos funcionais, nomeadamente ricos em compostos antioxidantes. Os compostos antioxidantes são de especial interesse devido à sua capacidade de neutralizar ROS e espécies reativas de azoto (RNS), bem como de prevenir o stress oxidativo, condição associada ao dano de biomoléculas, como proteínas, lípidos e ADN (Adjimani & Asare, 2015; Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Najman *et al.*, 2023).

Entre as diversas bebidas atualmente estudadas, a cerveja tem-se destacado pelo seu conteúdo de compostos bioativos com propriedades antioxidantes (Martinez-Gomez *et al.*, 2020). Esta bebida fermentada é composta por quatro ingredientes principais: água, malte lúpulo e leveduras (Borşa *et al.*, 2022). Os principais responsáveis pela presença de antioxidantes na cerveja são o malte e o lúpulo, dos quais aproximadamente 75% dos compostos fenólicos têm origem no malte, enquanto os 25% restantes provêm do lúpulo (Humia *et al.*, 2019). Além disso, foi relatado na literatura que o lúpulo não interfere significativamente no conteúdo fenólico, podendo ter outros compostos que contribuem para a sua atividade antioxidante (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Shopska *et al.*, 2021).

O malte empregue na produção de cerveja pode ser de diferentes origens, como o malte de cevada (o mais utilizado), trigo, milho, sorgo, entre outros (Prado *et al.*, 2021; Shopska *et al.*, 2021). Esta matéria-prima exerce um papel fundamental na estabilidade da cerveja durante o seu armazenamento, bem como nas suas propriedades organolépticas, como cor, aroma e sabor, características que podem variar dependendo dos parâmetros do processo de maltagem ao qual o malte foi submetido. Realça-se que este processo também interfere com o conteúdo fenólico do malte (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2021).

Neste contexto, a presente revisão da literatura apresenta como objetivo a compilação de informação científica relativa à atividade antioxidante do malte utilizado na produção de cerveja, com ênfase na sua composição química, nos fatores que influenciam esta atividade biológica e nos ensaios antioxidantes utilizados.

4.1.1. Malte: definição e processo de produção

O malte utilizado na produção de cerveja pode ser obtido a partir de diversos grãos de cereais, como cevada, trigo, milho, centeio, assim como de sementes de leguminosas (Prado *et al.*, 2021; Salamon *et al.*,



2023). Este fornece açúcares, proteínas, azoto e enzimas que auxiliam nas reações de fermentação na produção da cerveja (Bettenhausen *et al.*, 2018).

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) tem sido o principal cereal utilizado mundialmente na produção de malte, devido a questões culturais e económicas, bem como às suas características bioquímicas e fisiológicas, nomeadamente a sua elevada disponibilidade em hidratos de carbono e proteínas. As cascas deste cereal auxiliam na filtração do mosto, conferem uma textura firme ao grão e protegem o broto durante a germinação, além deste apresentar um número adequado de enzimas para a produção de malte e cerveja (Prado *et al.*, 2021; Rani & Bhardwaj, 2021).

Para o malte ser utilizado na produção da cerveja, este necessita de passar pelo processo de maltagem, que se caracteriza pela germinação controlada de cereais a uma temperatura reduzida (Humia *et al.*, 2019) e compreende três etapas principais (Figura 7): maceração, germinação e secagem (Rani & Bhardwaj, 2021).

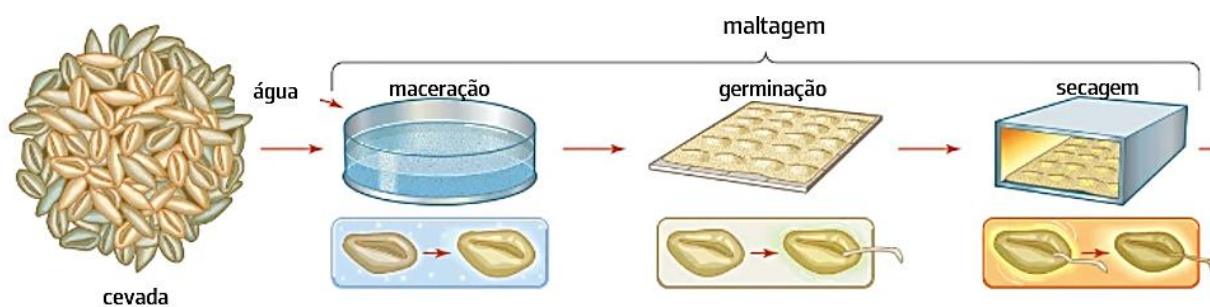


Figura 7. Esquema do processo de maltagem (Adaptado de Young Thomas, 2024).

A primeira etapa consiste na limpeza dos grãos, de forma a garantir o mínimo de contaminantes que possam comprometer a qualidade e o sabor da cerveja. Como tal, os grãos são submetidos a uma pré-limpeza para remover as impurezas mais grosseiras. De seguida, são eliminados contaminantes de tamanho semelhante ao dos grãos, como grãos subdimensionados, sementes de outras plantas e grãos danificados (Prado *et al.*, 2021; Rani & Bhardwaj, 2021). Por fim, realiza-se a classificação, que se baseia na separação dos grãos segundo o seu tamanho. Esta separação por tamanhos é relevante uma vez que a sua dimensão pode influenciar a absorção de água e as taxas de modificação na maltagem (Rani & Bhardwaj, 2021; Schwarz & Li, 2011).

A maltagem inicia-se com a maceração, durante a qual os grãos são embebidos em água até atingirem um teor de humidade entre 42% e 47%, dependendo do tipo de malte. Para os maltes claros, o grau ideal de maceração varia entre os 42% e 44%, de forma a limitar as reações de transformação e evitar perdas



por formação de radículas. Relativamente aos maltes especiais, é requerido um nível de humidade mais elevado, até 47%, de modo a potenciar a atividade enzimática e o metabolismo do grão (Prado *et al.*, 2021; Rani & Bhardwaj, 2021). A maceração ocorre em ciclos de imersão e repouso ao ar, com a duração de dois a quatro dias, sob temperatura controlada (12–18°C) e aeração adequada (Rani & Bhardwaj, 2021). Durante esta fase e quando atingido o nível de hidratação, o embrião retoma as atividades metabólicas e inicia a produção de ácido giberélico que estimula a síntese de enzimas hidrolíticas essenciais à germinação, como enzimas citolíticas, proteases, fosfatases, amilases e lipases que modificam o grão (Prado *et al.*, 2021; Rani & Bhardwaj, 2021). As enzimas citolíticas (β -glucanases e pentosanases) degradam a parede celular e facilitam o acesso de açúcares e precursores de aroma (Prado *et al.*, 2021; Vivian *et al.*, 2016). As proteases (carboxipeptidases e endopeptidases) decompõem as proteínas em peptídeos e aminoácidos, que são relevantes na formação da espuma, nutrição da levedura e na formação de compostos aromáticos que serão precursores das reações de *Maillard*. As amilases (α -amilase e β -amilase), fosfatases e lípases atuam na degradação do amido, dos lípidos em glicerol e ácidos gordos e na libertação de ácidos orgânicos por meio da decomposição de compostos fosfóricos, respetivamente (Prado *et al.*, 2021; Vivian *et al.*, 2016).

Após a maceração, segue-se a germinação, etapa caracterizada pelo crescimento do embrião (desenvolvimento de radículas e aumento do comprimento do broto), síntese enzimática e a degradação limitada do endosperma (Yang *et al.*, 2021). Esta fase dura de três a seis dias, em condições aeróbicas e húmidas, com temperaturas entre 16–20°C. A temperatura e a duração variam de acordo com o tipo de malte: maltes escuros requerem germinação a temperaturas mais elevadas e períodos mais longos comparativamente com maltes claros. Estas condições favorecem a formação de substratos para as reações de *Maillard*, conseqüentemente, intensificam a cor e o sabor do malte (Prado *et al.*, 2021; Rani & Bhardwaj, 2021). No decorrer desta etapa, ocorre a síntese das enzimas hidrolíticas anteriormente mencionadas, que são libertadas no endosperma interno que decompõem a sua parede celular, proteínas e compostos de amido, de forma a transformar o endosperma originalmente duro mais friável (Farzaneh *et al.*, 2017; Rani H. & Bhardwaj, 2021). Por fim, os produtos hidrolisados pelas enzimas são transferidos para o embrião, promovendo o seu desenvolvimento. O grão germinado resultante é denominado de malte verde e é então submetido ao processo de secagem (Rani & Bhardwaj, 2021).

A secagem é uma etapa fundamental para o perfil sensorial e funcional dos maltes, sendo responsável pela formação da maioria dos compostos voláteis, pigmentos e alterações no conteúdo fenólico e propriedades antioxidantes (Shopska *et al.*, 2021). Este processo ocorre em duas fases: a secagem inicial, que reduz a humidade dos grãos e preserva as enzimas e a cura, onde temperaturas mais elevadas



(superiores a 85°C) promovem reações de escurecimento não enzimáticas, como caramelização, pirólise (maltes torrados) e reações de *Maillard*, reações responsáveis pela produção de compostos essenciais para a cor, aroma e propriedades antioxidantes do malte. Destaca-se que diferentes perfis de malte requerem diferentes graus de escurecimento e complexidade de aroma, a temperatura aplicada e o tempo de exposição variam de acordo com o tipo de malte, influenciando diretamente a extensão das reações químicas envolvidas (Prado *et al.*, 2021). Nos maltes claros, a secagem deve reduzir a humidade do grão para valores inferiores a 5%, com a temperatura na fase de cura limitada a cerca de 85°C. Já nos maltes especiais, são aplicadas temperaturas superiores a 100°C e o teor de humidade final pode chegar até 1%, parâmetros que favorecem maior formação de compostos de *Maillard* (Prado *et al.*, 2021). Além de influenciar as características sensoriais, a secagem também contribui para a estabilidade e conservação do malte através da inativação de microrganismos e da redução do teor de humidade, permitindo o seu armazenamento a longo prazo (de Lima *et al.*, 2022).

4.1.2. Tipos de malte

As diferenças nos parâmetros aplicados no processo de maltagem, especialmente nas etapas de secagem ou cura, são determinantes para a qualidade do malte e para a sua classificação em diferentes tipos (de Lima *et al.*, 2022). A variação da temperatura e do tempo durante a secagem permite a obtenção de diferentes perfis de malte, os quais são classificados como maltes bases e maltes especiais (de Lima *et al.*, 2022; Liguori *et al.*, 2021).

Os maltes base são responsáveis por fornecer o sabor básico da cerveja e são utilizados como ingrediente principal e, geralmente, precedem os maltes especiais. Estes maltes fornecem açúcares fermentáveis que são metabolizados pelas leveduras durante a fermentação, produzindo álcool e compostos responsáveis pelo sabor (Adetokunboh *et al.*, 2022; de Lima *et al.*, 2022; Prado *et al.*, 2021). Relativamente aos maltes especiais, estes não só influenciam as características sensoriais da cerveja, como a cor e o sabor, como também apresentam elevados níveis de antioxidantes, contribuindo para a complexidade e diversidade da cerveja (Cai *et al.*, 2024; de Lima *et al.*, 2022). Estes maltes são utilizados em menores proporções comparativamente com os maltes base, devido à sua reduzida ou ausente atividade enzimática, nomeadamente α -amilase e β -amilase, enzimas que hidrolisam o amido em açúcares fermentáveis. Esta ausência enzimática resulta da aplicação de temperaturas mais elevadas no decorrer do processo de maltagem (Cai *et al.*, 2024; de Lima *et al.*, 2022).

A variedade de maltes varia consoante o processo térmico aplicado e da duração da secagem ou torrefação. Esta diversidade abrange desde os maltes base, como o malte claro e o malte Pilsner, até aos



maltes especiais, como o torrado, caramelizado e tostado. Consequentemente, os maltes também se distinguem pela cor, variando entre os tons amarelo-claro, âmbar, castanho e quase preto, com valores compreendidos entre 3 a 1600 unidades EBC (*European Brewery Convention*) (Adetokunboh *et al.*, 2022; Ualema *et al.*, 2024).

4.1.3. Composição química do malte e atividade antioxidante

A composição química do malte, incluindo o seu perfil fenólico e potencial antioxidante, é influenciada por diversos fatores, como a tecnologia de produção, as condições de armazenamento, o tipo de grão utilizado e a qualidade da matéria-prima, que pode ser afetada por fatores ambientais e genéticos (Bettenhausen *et al.*, 2018; Shopska *et al.*, 2021; Vingrys *et al.*, 2022).

Apesar da cevada ser o grão mais utilizado para a produção da cerveja, outros cereais, como trigo e sorgo, por exemplo, também podem ser empregues na composição desta bebida e, consequentemente, influenciam a sua composição química (Prado *et al.*, 2021; Rani H. & Bhardwaj, 2021; Vingrys *et al.*, 2022). A cevada apresenta uma variedade de fitoquímicos, como ácidos fenólicos, flavonóides, ligninas, fitoesteróis e folatos. Dentro da classe dos ácidos fenólicos, destaca-se o ácido ferúlico, que representa 68% do total de ácidos fenólicos presentes neste grão, além do ácido vinílico, ácido siríntrico e ácido *p*-cumárico. Além disso, os flavonóis e antocianinas são os principais tipos de flavonóides presentes na cevada (Idehen *et al.*, 2017).

O trigo é frequentemente utilizado na maltagem e apresenta uma variedade de compostos fenólicos e flavonóides, destacando-se o ácido ferúlico como o composto mais abundante. Outros ácidos fenólicos, tais como o ácido gálico, benzóico e vanílico também estão presentes. Salienta-se que a quantidade desses compostos pode variar consoante a espécie de trigo utilizada, bem como as condições de cultivo e processamento (Byeon *et al.*, 2022; Lacko-Bartošová *et al.*, 2023).

O sorgo também é uma fonte de compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos e flavonóides como a luteolina, apigenina, eriodictiol e naringenina. No que respeita aos ácidos fenólicos, os principais compostos presentes neste grão são o ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico e ácido *p*-cumárico (Xu *et al.*, 2021).

O processo de produção da cerveja é complexo e, consequentemente, a composição e concentração das substâncias provenientes das matérias-primas podem sofrer alteração ao longo das diferentes etapas, nomeadamente durante a maltagem (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Shopska *et al.*, 2021). De modo geral, durante a maceração, é relatada uma diminuição dos compostos fenólicos; na germinação, esses compostos aumentam; e na secagem, aumentam juntamente com a formação de melanoidinas



(Martinez-Gomez *et al.*, 2020). Contudo, tanto a variação do grão quanto as diferentes condições de maltagem influenciam o perfil bioquímico do malte (Vingrys *et al.*, 2022).

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de maltagem influencia a composição fenólica e, conseqüentemente, a atividade antioxidante do malte. Leitaó *et al.* (2012) investigaram as alterações nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante da cevada durante a maltagem. Neste estudo, os compostos prodelphinidina B3, procianidina B3 e catequina foram identificados como os principais contribuintes para a atividade antioxidante da cevada, mas apresentaram uma redução acentuada após a maltagem. Em contrapartida, o ácido ferúlico e sinápico demonstraram maior estabilidade face aos tratamentos térmicos do processo. De forma geral, o estudo mostrou que a maltagem favorece a libertação e extração de compostos fenólicos, enquanto a primeira etapa da produção da cerveja reduziu drasticamente os polifenóis totais e a sua atividade antioxidante. Por sua vez, Vingrys *et al.* (2022) avaliaram a atividade antioxidante e o TPC em amostras maltadas e não maltadas de cevada, trigo e sorgo, entre outros cereais. O estudo demonstrou que o processo de maltagem aumentou significativamente o TPC, bem como a atividade antioxidante recorrendo ao ensaio DPPH ($p < 0,05$). A cevada maltada apresentou os maiores valores de TPC e de capacidade antioxidante, sendo este aumento atribuído às etapas de germinação e secagem. Além disso, foi observada uma diminuição na concentração de ácido ferúlico ao longo da maltagem, o que pode estar associado à atividade enzimática durante a germinação e à degradação térmica durante a secagem.

Desta forma, é relatado na literatura que as temperaturas aplicadas no malte durante a secagem e a torrefação podem originar diferentes alterações na sua composição química. Em alguns casos, verifica-se a degradação de compostos fenólicos (como os ácidos fenólicos), em outros a sua polimerização (como as proantocianidinas), o que pode estar associado à formação de melanoidinas por meio da reação de *Maillard*, a qual começa a se desencadear na fase de secagem (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Shopska *et al.*, 2021).

4.1.4. Reação de *Maillard* em maltes

A reação de *Maillard* é uma reação de escurecimento não enzimática que ocorre entre açúcares redutores e compostos, como aminoácidos, proteínas ou peptídeos, quando submetidos a temperaturas elevadas (Nooshkam *et al.*, 2020; Shakoó *et al.*, 2022). Esta reação contribui para a formação de sabor, cor e estabilidade dos alimentos, além de originar compostos com diversas atividades biológicas, como a antibacteriana e antioxidante, por exemplo (Nooshkam *et al.*, 2020; Shakoó *et al.*, 2022). As melanoidinas são produtos finais desta reação, caracterizados pela sua coloração castanha e elevado



peso molecular, que influenciam a cor, sabor e textura dos produtos (Félix-Medina *et al.*, 2024). Destaca-se que as melanoidinas também se podem apresentar com baixo peso molecular, sendo o peso um fator relacionado com a intensidade e o tempo de aquecimento (Aljahdali *et al.*, 2020).

Os diferentes perfis de maltes distinguem-se por uma série de características e parâmetros relacionados com a sua composição química e as etapas do processo de produção. As reações de *Maillard* são importantes para as características dos maltes especiais e iniciam-se com temperaturas a partir de 50°C (Prado *et al.*, 2021). Nos maltes base, são utilizadas temperaturas próximas de 85°C, aplicadas essencialmente para reduzir e interromper a atividade enzimática. Desta forma, apesar das temperaturas aplicadas não serem muito elevadas, podem formar-se corantes de baixo peso molecular (cromóforos) resultantes da reação de *Maillard*, os quais influenciam a cor dos maltes (Prado *et al.*, 2021; Ualema *et al.*, 2024).

Quanto aos maltes especiais, as temperaturas utilizadas durante o seu processo são, geralmente, superiores a 100°C, o que favorece a intensidade das reações de *Maillard* e, conseqüentemente, a formação de uma variedade de compostos responsáveis por dar a cada malte, o sabor e cor característicos. Neste tipo de malte, são formados compostos importantes através da reação de *Maillard*, como furanos, aldeídos, pirróis, pirazinas e melanoidinas. Os maltes caramelo, por exemplo, apresentam corantes de coloração castanho-claro e baixo peso molecular e o seu perfil sensorial, caracterizado por apresentar notas doces, caramelo e mel, é atribuído à presença de compostos heterocíclicos de oxigénio, como furanos, furanonas e pironas. Os maltes torrados, submetidos a temperaturas muito elevadas (superiores a 200 °C), apresentam uma coloração castanho-escura, devido à presença de corantes de elevado peso molecular, sendo que o seu sabor resulta principalmente da formação de compostos heterocíclicos contendo azoto, como pirazinas, piridinas e pirróis (Castro *et al.*, 2021; Prado *et al.*, 2021).

Além do malte contribuir para a cor e características organolépticas da cerveja, o seu potencial antioxidante é crucial na manutenção da estabilidade oxidativa da cerveja, bem como na saúde dos consumidores, uma vez que previne e neutraliza os ROS. Este potencial antioxidante deve-se essencialmente aos compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonóides, bem como aos produtos da reação de *Maillard* (Carvalho *et al.*, 2014; Shopska *et al.*, 2021).

4.1.5. Atividade antioxidante em maltes

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas que apresentam um ou mais eletrões desemparelhados, como, por exemplo, os ROS, nomeadamente o radical superóxido, radical hidroxilo e H₂O₂ (Adjimani & Asare, 2015; Baliyan *et al.*, 2022). As ROS podem ser geradas por fatores externos ou



internos e, geralmente, são eliminadas pela presença de antioxidantes. Contudo, se ocorrer a superprodução de ROS ou se a capacidade de neutralização do sistema antioxidante estiver em desequilíbrio, pode favorecer o stress oxidativo e conseqüentemente o dano de diversas biomoléculas como, proteínas, lípidos e ADN, por exemplo (Adjimani & Asare, 2015). Desta forma, os compostos antioxidantes apresentam um papel crucial na neutralização da produção de radicais, reduzindo e prevenindo possíveis danos causados. Estes compostos (ex.: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, carotenóides) podem ser encontrados em plantas e outros produtos naturais (Baliyan *et al.*, 2022). Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante de diversos tipos de malte utilizados na produção da cerveja, com base em ensaios como o DPPH, ABTS, a capacidade de absorção de radicais livres do oxigénio (ORAC), o poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) e MCA (Koren *et al.*, 2019; Shopska *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022; G. Wu *et al.*, 2025).

Shopska *et al.* (2021) avaliaram o perfil antioxidante e o conteúdo fenólico de 20 tipos diferentes de malte utilizados na indústria cervejeira. Demonstraram uma relação entre a intensidade da cor do malte e o seu TPC, sendo que os maltes submetidos a um grau de tratamento térmico superior apresentaram maior TPC e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante. Os valores de TPC variaram de 169,69 a 555,71 mg/dm³ para os maltes base, como o Pale Ale e Pilsen, enquanto alguns maltes especiais apresentaram valores superiores a 800 mg/dm³, como o malte Chocolate, Caramel Munich I e Caramel Munich II. Os resultados da atividade antioxidante também foram menores nos maltes base, em comparação com os maltes especiais. A gama de valores obtidos nos ensaios antioxidantes dos maltes base variou entre 1347,9 a 7784,0 µmol Trolox/dm³ para o ensaio DPPH e ORAC, respetivamente. Os maltes especiais apresentaram valores entre 1728,5 a 11842,0 µmol Trolox/dm³ nos mesmos ensaios. Relataram que a atividade antioxidante conferida pelos maltes mais escuros não se deve unicamente à presença dos compostos fenólicos, mas também aos produtos da reação de *Maillard*. Por outro lado, os maltes base apresentaram baixa atividade antioxidante devido ao baixo TPC registado. Embora este tipo de malte tenha apresentado baixa atividade inibitória sobre o radical DPPH, evidenciou um melhor resultado na capacidade redutora de metais, determinado pelo ensaio FRAP.

O estudo realizado por Koren *et al.* (2019) avaliou a evolução da atividade antioxidante, através de cinco ensaios, como o DPPH, ABTS, a capacidade antioxidante de redução cúprica (CUPRAC), FRAP e TPC) no decorrer do processo de fabrico de diferentes tipos de cerveja, nomeadamente durante a maltagem, com recurso a seis variedades de cevada, três de primavera e três de inverno. Os resultados demonstraram que todas as amostras de cevada em estudo apresentaram maior atividade antioxidante após a maltagem, especificamente no final da maceração e nos primeiros dias da germinação, seguido



de uma ligeira diminuição. No decorrer da secagem, foram observadas tendências distintas entre as variedades. O maior aumento de TPC foi registado na variedade Casanova, com valores de 8,1 mg/100 g de Equivalente ao Ácido Ascórbico (AAE) expressos em matéria seca (d.m.) antes da maltagem para 61,6 mg/100g AAE d.m. Também foram registados aumentos nos ensaios antioxidantes: o DPPH apresentou valores de 19,8 para 24,4 mg/100g AAE d.m.; CUPRAC de 35,3 para 63,3 mg/100g AAE d.m.; FRAP de 22,2 para 30,5 mg/100g AAE d.m.; e ABTS de 109,4 para 155,6 mg/100g AAE d.m. Os resultados demonstraram uma tendência geral para o aumento da atividade antioxidante durante a maltagem.

O estudo realizado por Silva *et al.* (2022), avaliou os parâmetros físico-químicos, TPC e a atividade antioxidante (ensaios de DPPH e MCA) de cervejas artesanais portuguesas, bem como das suas matérias-primas, nomeadamente 10 amostras de malte (nove de cevada e uma de trigo) incluindo maltes base e especiais. Os resultados apresentaram uma variação na capacidade antioxidante entre os maltes, como o malte Pale Ale (base) apresentando a maior inibição do radical DPPH ($96,0 \pm 2,1\%$) e o malte de trigo (base) a menor percentagem de inibição ($36,5 \pm 2,8\%$). Entre os maltes especiais, o Biscuit e Crystal Light destacaram-se com uma elevada atividade antioxidante no ensaio do DPPH ($90,7 \pm 2,2\%$ e $90,5 \pm 5,4\%$, respetivamente). Além disso, o malte Munich (base) apresentou a maior capacidade quelante de metais ($24,8 \pm 0,6\%$), seguido pelo malte especial Carapils ($20,5 \pm 0,7\%$).

Wu *et al.* (2025) avaliaram o impacto de diferentes métodos de torrefação na estrutura das proteínas e na atividade antioxidante dos complexos proteína-polifenol, formados em três tipos de maltes de cevada. Foram analisadas quatro proteínas provenientes do malte, albumina, globulina, prolamina e glutelina, de forma isolada e em complexos com polifenóis, através de três ensaios antioxidantes: ABTS, FRAP e ORAC. A torrefação promoveu alterações estruturais nas proteínas, que favoreceu a ligação de compostos fenólicos, levando à formação de complexos que apresentam maior capacidade antioxidante. O complexo com a albumina diminuiu com o aumento do grau de torrefação, apresentando maior capacidade antioxidante no malte crú através dos ensaios ABTS, FRAP e ORAC com valores de $76,07 \pm 0,33\%$, $0,35 \pm 0,014$ mM e $6,08 \pm 0,95$ μ mol de equivalentes de Trolox (TE)/g de amostra peso fresco (FW), respetivamente. Por outro lado, os complexos com glutelina, globulina e prolamina aumentaram a sua capacidade antioxidante com graus de torrefação maiores, nomeadamente no malte queimado e torrado. Os maiores valores registados foram, para o ensaio do ABTS de $80,34 \pm 0,19\%$ (glutelina), $74,12 \pm 0,22\%$ (globulina) e $65,21 \pm 3,77\%$ (prolamina); para o FRAP de $1,05 \pm 0,021$ mM, $0,29 \pm 0,019$ mM e $0,38 \pm 0,017$ mM, respetivamente; e para o ORAC de $18,62 \pm 1,50$ μ mol TE/g FW, $6,47 \pm 0,71$ μ mol TE/g FW, e $10,74 \pm 1,09$ μ mol TE/g FW, respetivamente.



Embora os estudos apresentem resultados claros do potencial antioxidante dos maltes e relacionem a sua composição fenólica e os produtos da reação de *Maillard*, ressalta-se que estes resultados podem variar significativamente entre eles dependendo, por exemplo, do tipo de solvente utilizado, da tecnologia de produção adotada, da variedade do grão e de fatores ambientais e genéticos aos quais este está sujeito (Bettenhausen *et al.*, 2018; Shopska *et al.*, 2021; Vingrys *et al.*, 2022; Xiang *et al.*, 2024).

4.1.6. Aplicabilidade dos maltes na estabilidade da cerveja

A utilização dos maltes na produção da cerveja, além de fornecer amido para a produção de açúcares fermentáveis e contribuir para a cor da cerveja final, também favorece a estabilidade oxidativa da bebida através dos compostos fenólicos e antioxidantes (Shopska *et al.*, 2021). Diversos grupos de compostos fenólicos foram relatados na cerveja, dos quais se destacam os ácidos fenólicos e taninos, e flavonas e flavonóis (Ambra *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos e os produtos da reação de *Maillard* provenientes do malte apresentam um papel crucial na estabilidade da cerveja (Carvalho *et al.*, 2014), nomeadamente no seu armazenamento, uma vez que as suas propriedades sensoriais se alteram durante o seu armazenamento através de várias reações químicas (Shopska *et al.*, 2021). Os polifenóis inibem as reações de deterioração oxidativa, contribuindo para uma maior estabilidade do sabor das cervejas por períodos mais prolongados (Castro *et al.*, 2021). Além disso, os produtos da reação de *Maillard* apresentam um elevado poder antioxidante e podem atuar através do *scavenging* de radicais livres e como quelantes de metais, por exemplo (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Shopska *et al.*, 2021).

A utilização de maltes especiais tem demonstrado melhorar a estabilidade da cerveja final, sendo que as cervejas produzidas com este tipo de maltes apresentam maior poder redutor durante o armazenamento (Martinez-Gomez *et al.*, 2020). Destaca-se que teor de compostos fenólicos na cerveja pode variar amplamente em função da quantidade e da qualidade das matérias-primas utilizadas, da região de cultivo e do seu processamento, com ênfase para a cerveja artesanal, que utiliza matérias-primas de elevada qualidade (Breda *et al.*, 2022; Villacreces *et al.*, 2022).

A informação descrita na revisão demonstra que o malte é uma das principais fontes de compostos fenólicos na cerveja, sendo determinante para a sua capacidade antioxidante. Esta atividade biológica encontra-se relacionada com diversos fatores, nomeadamente o tipo de grão utilizado e as condições aplicadas no processo de maltagem. Nos maltes especiais, as reações de *Maillard* são particularmente relevantes, uma vez que favorecem a formação de compostos (melanoidinas) com propriedades



antioxidantes. A variedade da composição desta matéria-prima, influenciada por diversos fatores, influencia a estabilidade oxidativa da cerveja e, conseqüentemente, as suas propriedades biológicas. Neste contexto, é relevante aprofundar a capacidade antioxidante associada aos maltes utilizados na produção de cervejas.

4.2. Parte II – Avaliação, *in vitro*, da atividade antioxidante em cervejas, maltes e lúpulos

4.2.1. Atividade antioxidante das matérias-primas

No trabalho, avaliou-se a atividade antioxidante de matérias-primas que compõem a cerveja, em particular o malte e lúpulo. Foram analisadas três amostras diferentes de malte e lúpulo (em termos de variedades) e dois tipos de extração (aquosa e hidroalcoólica). Os valores obtidos para o malte nos ensaios do ABTS, DPPH e MCA podem ser observados na tabela seguinte (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antioxidante das amostras aquosas e hidroalcoólicas do malte.

Matéria-prima	Denominação	Tipo de extração	IC ₅₀ (µg/mL)		
			ABTS	DPPH	MCA
	Controlo Positivo		2,05 ± 0,03 (Trolox)	1,8 ± 0,2 (Quercetina)	5,50 ± 0,03 (EDTA)
Malte	Chocolate Rye	Aquosa	ND	334,5 ± 7,6 ^{b,c,d}	ND
	Munich type I		ND	ND	ND
	Vienna		ND	ND	ND
	Chocolate Rye	Hidroalcoólica	370,5 ± 2,4	114,6 ± 2,2 ^{a,c,d}	969,5 ± 5,4 ^{c,d}
	Munich type I		ND	486,5 ± 7,0 ^{a,b,d}	767,2 ± 5,2 ^{b,d}
	Vienna		ND	443,3 ± 8,9 ^{a,b,c}	932,3 ± 2,0 ^{b,c}

ND – Não determinado. IC₅₀: Concentração inibitória média. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão de três amostras independentes (n = 3). ^a Significativamente diferente quando comparado com Chocolate Rye aquoso ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com Chocolate Rye hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com Munich type I hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^d Significativamente diferente quando comparado com Vienna hidroalcoólica ($p < 0,05$).

Vários fatores podem influenciar a atividade antioxidante dos produtos de origem natural, como a estrutura química dos compostos presentes, a natureza do solvente utilizado na extração, a temperatura e pH da técnica de extração, assim como a estrutura química dos radicais livres. Desta forma, no estudo das propriedades antioxidantes de produtos de origem natural, é importante utilizar pelo menos três



ensaios diferentes (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Ensaios como o DPPH e o ABTS são frequentemente utilizados para a avaliação da atividade antioxidante em cervejas e matérias-primas face à sensibilidade dos métodos, conveniência e tempo curto dos ensaios (Zhao, 2014).

O malte é a principal matéria-prima presente na constituição da cerveja, sendo responsável pela maior percentagem de compostos fenólicos, os quais contribuem no controlo de reações oxidativas e protegem a cerveja contra o envelhecimento através da eliminação de radicais livres, agentes redutores e por quelação de iões metálicos (Lu *et al.*, 2007; Shopska *et al.*, 2021).

Nas diferentes amostras de malte, os valores de IC_{50} variaram entre $114,6 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$ e $969,5 \pm 5,4 \mu\text{g/mL}$ (baixa atividade antioxidante). As amostras podem ser consideradas como tendo uma elevada ou significativa atividade antioxidante quando apresentam $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ (extratos) ou $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ (compostos isolados); uma moderada atividade antioxidante quando apresentam $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ (extratos) ou $10 < IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ (compostos isolados); e baixa atividade antioxidante quando se observa um $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (extratos) ou $IC_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ (compostos) (Kuetze & Efferth, 2010).

Relativamente às amostras aquosas dos maltes, apenas o malte Chocolate Rye apresentou um valor de IC_{50} ($334,5 \pm 7,6 \mu\text{g/mL}$) para o ensaio DPPH. Nas restantes amostras de malte aquosas e para as concentrações testadas (entre $5 \mu\text{g/mL}$ e $1000 \mu\text{g/mL}$) não foi possível determinar valores de IC_{50} . Apesar de ser considerada uma baixa atividade antioxidante, o resultado obtido para o malte Chocolate Rye pode ser explicado devido à presença de melanoidinas, as quais são formadas através da reação de *Maillard* que ocorre principalmente nos maltes escuros, devido à presença de elevadas temperaturas. As melanoidinas foram descritas na literatura como compostos que apresentam elevado potencial redutor (Carvalho *et al.*, 2014; Shopska *et al.*, 2021).

Por sua vez, os extratos hidroalcoólicos apresentaram, no geral, melhores valores, sendo que apenas o extrato hidroalcoólico de malte Chocolate Rye apresentou um valor de IC_{50} para o ensaio DPPH ($370,5 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$), e apresentou o menor valor de IC_{50} para o ensaio ABTS ($114,6 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$). Os maltes Munich type I e Vienna apresentaram valores próximos no ensaio DPPH ($IC_{50} = 486,5 \pm 7,0 \mu\text{g/mL}$ e $443,3 \pm 8,9 \mu\text{g/mL}$, respetivamente). Os resultados obtidos estão em concordância com os dados de Shopska *et al.* (2021), que demonstraram uma melhor atividade antioxidante (no ensaio do DPPH) para o malte Chocolate em comparação com o malte Vienna e a variedade de malte Munich, utilizados no estudo.

Relativamente à avaliação da MCA, apenas se obtiveram valores de IC_{50} para os extratos hidroalcoólicos, tendo-se verificado que o malte Munich Type I apresentou o menor valor de IC_{50} ($767,2 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$). Por sua vez, os maltes Vienna e Chocolate Rye registaram maiores valores de IC_{50} ($932,3$



$\pm 2,0 \mu\text{g/mL}$ e $969,5 \pm 5,4 \mu\text{g/mL}$, respetivamente). O estudo de Silva *et al.* (2022) também registou maiores valores de quelação do ferro para a variedade de malte Munich ($24,8 \pm 0,6\%$) comparativamente com o malte Chocolate ($14,2 \pm 0,6\%$). Os compostos presentes no malte Chocolate parecem apresentar alguma capacidade para eliminar o radical DPPH e o radical catiónico ABTS, contudo o mesmo não se verifica para a quelação de iões metálicos.

Os estudos de Shopska *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2022) utilizaram diferentes solventes nas extrações, metanol e água, respetivamente. A seleção do solvente é crucial para o processo de extração, uma vez que a sua polaridade pode influenciar a presença de compostos bioativos, nomeadamente de compostos fenólicos na amostra (Baron *et al.*, 2021; Catena *et al.*, 2020; Kaczorová *et al.*, 2021).

Neste trabalho selecionou-se a água e uma mistura hidroalcoólica para a extração do malte e lúpulo. A água é um solvente facilmente acessível, barato, não tóxico, não inflamável. Além disso, é um solvente polar, com afinidade para compostos polares como os fenóis. A água tem sido utilizada como alternativa para a recuperação de compostos fenólicos provenientes da cerveja e de matérias-primas utilizadas na sua produção (Cortese *et al.*, 2020; Cvjetko Bubalo *et al.*, 2018; Panja, 2018). Além disso, solventes orgânicos polares, como o metanol, etanol, acetato de etilo e acetona, assim como as suas combinações com água, são geralmente utilizados para a extração de compostos fenólicos. Entre estes solventes, o etanol apresenta algumas vantagens, uma vez que é relativamente seguro para o consumo humano, sendo amplamente utilizado para a extração de compostos bioativos de origem vegetal. As misturas de etanol e água são mais polares em comparação com o etanol absoluto, o que pode influenciar positivamente o rendimento de compostos fenólicos livres (Hikmawanti *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2011).

Nas amostras em estudo, observaram-se melhores valores de atividade antioxidante nas amostras etanólicas, comparativamente com as aquosas, provavelmente devido à maior solubilidade de compostos fenólicos em etanol, em relação à água. O lúpulo desempenha um papel importante na composição da cerveja, melhorando a sua preservação, estabilidade da espuma e conferindo um sabor amargo à cerveja (Wu *et al.*, 2020). A Tabela 4 descreve os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes para os extratos de lúpulo.

Neste estudo, foram avaliadas três variedades de lúpulo através do ensaio DPPH, ABTS e MCA (Tabela 4). Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras em estudo para cada um dos ensaios ($p < 0,05$). No ensaio de neutralização do radical DPPH, os resultados de IC_{50} para as amostras variaram entre $7,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ (ensaio de DPPH, extrato hidroalcoólico da variedade Citra) (elevada atividade antioxidante) e $411,9 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$ (ensaio MCA, extrato aquoso da variedade Mosaic) (baixa atividade antioxidante).



Tabela 4. Atividade antioxidante das amostras aquosas e etanólicas do lúpulo.

Matéria-prima	Denominação	Extração	IC ₅₀ (µg/mL)		
			ABTS	DPPH	MCA
	Controlo Positivo		2,05 ± 0,03 (Trolox)	1,8 ± 0,2 (Quercetina)	5,50 ± 0,03 (EDTA)
Lúpulo	Citra	Aquosa	136,9 ± 8,3 ^{c,d,f}	31,5 ± 1,0 ^{b,c,d,e,f}	217,0 ± 10,0 ^{b,c,d,e,f}
	Mosaic		237,6 ± 5,3 ^{a,b,d,e,f}	64,6 ± 3,5 ^{a,b,e,f}	411,9 ± 4,6 ^{a,b,d,e,f}
	Saaz		137,8 ± 4,3 ^{c,d,f}	24,3 ± 1,5 ^{a,b,c,d}	124,6 ± 3,4 ^{a,b,c,d,f}
	Citra	Hidroalcoólica	127,14 ± 3,9 ^{c,d,f}	7,4 ± 0,2 ^{a,c,d,e,f}	103,2 ± 2,3 ^{a,c,d,e,f}
	Mosaic		161,2 ± 3,7 ^{a,b,c,e,f}	32,2 ± 0,7 ^{b,c,e,f}	79,3 ± 6,1 ^{a,b,c,e,f}
	Saaz		262,80 ± 6,4 ^{a,b,c,d,e}	55,7 ± 2,6 ^{a,b,c,d,e}	31,4 ± 7,9 ^{a,b,c,d,e}

IC₅₀: Concentração inibitória média. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3). ^a Significativamente diferente quando comparado com Citra aquoso ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com Citra hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com Mosaic aquoso ($p < 0,05$); ^d Significativamente diferente quando comparado com Mosaic hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^e Significativamente diferente quando comparado com Saaz aquoso ($p < 0,05$); ^f Significativamente diferente quando comparado com Saaz hidroalcoólica ($p < 0,05$).

No caso dos extratos aquosos de lúpulo e para o ensaio do DPPH, duas variedades obtiveram valores de IC₅₀ abaixo de 50 µg/mL (elevada atividade antioxidante) (variedade Saaz, IC₅₀ = 24,3 ± 1,5 µg/mL; variedade Citra, IC₅₀ = 31,5 ± 1,0 µg/mL), enquanto que uma terceira variedade (Mosaic) obteve um valor de IC₅₀ de 64,6 ± 3,5 µg/mL. Estes resultados foram superiores, no que diz respeito ao potencial antioxidante, aos obtidos por Lyu *et al.* (2022). Estes autores observaram, para os extratos aquosos de lúpulo e ensaio do DPPH, valores de IC₅₀ a variar entre 192,41 e 342,60 µg/mL (Lyu *et al.*, 2022). Também no estudo de Silva *et al.* (2022), foram avaliadas diferentes variedades de lúpulos, incluindo o Mosaic e Citra, onde se observaram valores de neutralização do DPPH acima de 75% para estas variedades (Citra, 76,4 ± 2,4%; Mosaic, 78,3 ± 0,5%). Inui *et al.* (2017) avaliaram a atividade antioxidante, entre outros parâmetros, de lúpulos variedade Saaz cultivados na República Checa em diferentes anos e épocas de colheita, verificando alterações na composição de polifenóis, o que influenciou a atividade antioxidante.

No caso dos extratos hidroalcoólicos de lúpulo, e para o ensaio do DPPH os valores de IC₅₀ variaram entre 7,4 ± 0,2 µg/mL e 55,7 ± 2,6 µg/mL, apresentando diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Mais uma vez, os valores encontrados neste trabalho foram superiores (em termos de potencial antioxidante) que os encontrados por Lyu *et al.* (2022), onde para o extrato etanólico (60%) os valores de IC₅₀ variaram entre 124,25 e 342,29 µg/mL.



No geral e para todos os ensaios realizados, os extratos hidroalcoólicos obtiveram valores de IC_{50} mais baixos face aos extratos aquosos. A extração do lúpulo com o etanol resulta numa composição mais complexa dos extratos, uma vez que o etanol co-extrai compostos mais polares, como os polifenóis. Além disso, as misturas hidroalcoólicas são mais polares comparativamente com o etanol absoluto, o que permite um melhor rendimento de compostos fenólicos. Nestas extrações também é relatada a presença de uma grande quantidade de ácidos amargos, prenilflanonóides, nomeadamente o xantohumulol, óleos essenciais, iso- α -ácidos (Hikmawanti *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2011; Verhagen, 2010).

Apenas o extrato hidroalcoólico da variedade Saaz obteve um valor de IC_{50} superior face ao extrato aquoso ($262,80 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ e $137,8 \pm 4,3 \mu\text{g/mL}$, respetivamente, para o ensaio ABTS; $55,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ e $24,3 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ respetivamente, para o ensaio DPPH). No estudo de Lyu *et al.*, (2022), avaliaram-se diferentes variedades de lúpulo, entre as quais a variedade Saaz (proveniente de quatro zonas geográficas diferentes). No caso das variedades Saaz1, Saaz2, Saaz3, os valores de IC_{50} nos extratos etanólicos (60%) foram inferiores aos extratos aquosos (nos ensaios do DPPH e ABTS). No entanto, no caso da variedade Saaz4 os valores de IC_{50} do extrato aquoso foram inferiores aos observados para o extrato etanólico. Desta forma, o extrato de lúpulo contém vários compostos antioxidantes solúveis em água, mas esses compostos podem ser acumulados de forma diferencial no estróbilo do lúpulo, dependendo das condições ambientais ou das variedades de lúpulo (Lyu *et al.*, 2022).

A MCA nas amostras aquosas em estudo variou entre $124,6 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$ (lúpulo Saaz) e $411,9 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$ (lúpulo Mosaic) (baixa atividade antioxidante). No estudo de Silva *et al.* (2022), analisaram a atividade quelante de metais em 11 variedades de lúpulo, observando-se percentagens de quelação do ferro baixas (entre $3,8 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ e $23,5 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$). Entre as diversas variedades, analisaram o lúpulo Citra e Mosaic ($18,3 \pm 1,6 \%$ e $12,3 \pm 1,1 \%$, respetivamente) e relataram valores inferiores comparativamente com o presente estudo.

Comparando, de uma forma geral, a atividade antioxidante entre maltes e lúpulos (através dos ensaios ABTS, DPPH e MCA), no caso dos maltes, ou não se observou valores de IC_{50} ou os valores foram $> 100 \mu\text{g/mL}$. Por sua vez, no caso dos lúpulos, em todas as variedades observaram-se valores de IC_{50} , e em duas variedades com valores de $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. Tal pode ser explicado pelo facto de, no caso dos lúpulos, o principal mecanismo pelo qual os ácidos derivados do lúpulo atuam como antioxidantes é pela quelação do ferro e pela eliminação de radicais (Kunz *et al.*, 2014). Os lúpulos apresentam um elevado teor de compostos bioativos, como resinas, óleos essenciais e polifenóis, incluindo flavan-3-óis, flavonóis, ácidos carboxílicos fenólicos e prenilflavonoides, os quais exibem uma elevada capacidade antioxidante (Santarelli *et al.*, 2022). É importante destacar que existe uma ampla variedade de lúpulos



e, dependendo da sua composição química, estes apresentam uma grande variedade de aromas, como cítrico, floral, lupulado, entre outros (Santarelli *et al.*, 2022). As diferenças observadas nos trabalhos para os extratos de lúpulo e a atividade antioxidante, podem ser justificadas pelos diferentes métodos de cultivo e períodos de colheita, os quais poderão afetar o perfil químico do lúpulo e, conseqüentemente, a sua atividade antioxidante (Breda *et al.*, 2022; Inui *et al.*, 2017).

4.2.2. Atividade antioxidante das cervejas

Para além das matérias-primas utilizadas na produção de cervejas, avaliou-se o potencial antioxidante de duas amostras de cervejas artesanais e uma amostra de cerveja industrial (ambas portuguesas), recorrendo a dois tipos de extração (aquosa e hidroalcoólica).

Relativamente aos estilos, neste estudo foram analisadas duas cervejas do estilo Stout e uma do estilo Porter. A cerveja do estilo Stout e Porter apresenta uma coloração escura, variando do castanho escuro ao preto no caso do estilo Stout, e tons de castanho escuro com ou sem notas avermelhadas, no estilo Porter. Esta coloração deve-se à sua composição rica em maltes escuros, como o malte castanho, malte chocolate e, no caso das Stouts, malte queimado. Além disso, o estilo Stout apresenta um sabor fortemente torrado comparado ao estilo Porter, que é mais suave neste aspeto. Relativamente ao álcool, de modo geral, as Stouts tendem a possuir maior teor alcoólico em comparação com as Porter, variando de 4% a 12% e 4% a 9,5%, respetivamente. Além disso, a literatura relata que o estilo Stout é mais rico em nutrientes, com o teor de aminos ácidos 3 a 4 vezes superior em relação a outros estilos de cerveja (Casa Da Cerveja, 2024 ; Tian *et al.*, 2024). A Tabela 5 resume os valores obtidos, para os diferentes ensaios, nas cervejas artesanais.

Os valores de IC_{50} , obtidos apenas nos ensaios do DPPH e ABTS, variaram entre $230,8 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ (solvente água, ensaio DPPH) e $963,8 \pm 8,1 \mu\text{g/mL}$ solvente água, ensaio ABTS) (baixa atividade antioxidante). Regra geral (excepto na cerveja SB-S, ensaio DPPH) as cervejas dissolvidas em etanol obtiveram melhor capacidade antioxidante (com menores valores de IC_{50}).

Analisando as cervejas preparadas em solvente aquoso, no ensaio de ABTS, a amostra SB-S apresentou o menor valor de IC_{50} ($935,70 \pm 6,9 \mu\text{g/mL}$), seguida da BP-N ($963,8 \pm 8,1 \mu\text{g/mL}$). A amostra IS-N não apresentou valor de IC_{50} . Relativamente ao ensaio DPPH, obteve-se o menor valor de IC_{50} para a amostra IS-N ($350,0 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$), seguida da SB-S ($384,1 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$), enquanto a BP-N apresentou um valor de IC_{50} significativamente mais elevado ($640,0 \pm 8,7 \mu\text{g/mL}$), ambas as amostras apresentaram diferença estatística entre elas ($p < 0,05$).



Tabela 5. Atividade antioxidante das cervejas artesanais e industriais.

Codificação Cerveja	Solvente	IC ₅₀ (µg/mL)		
		ABTS	DPPH	MCA
Controlo Positivo		2,05 ± 0,03 (Trolox)	1,8 ± 0,2 (Quercetina)	5,50 ± 0,03 (EDTA)
BP-N	Aquosa	963,8 ± 8,1 ^{b,d,f}	640,0 ± 8,7 ^{b,c,d,e,f}	ND
IS-N		ND	350,0 ± 5,0 ^{a,b,d,e,f}	ND
SB-S		935,70 ± 6,9 ^{b,d}	384,1 ± 4,5 ^{a,b,c,d,f}	ND
BP-N	Hidroalcoólica	779,8 ± 13,2 ^{a,d,e,f}	542,9 ± 5,0 ^{a,c,d,e,f}	ND
IS-N		616,6 ± 6,9 ^{a,b,e,f}	230,8 ± 4,8 ^{a,b,c,e,f}	ND
SB-S		909,2 ± 15,8 ^{a,b,d}	505,2 ± 6,1 ^{a,b,c,d,e}	ND

ND – Não determinado. IC₅₀: Concentração inibitória média. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3).^a Significativamente diferente quando comparado com BP-N aquoso ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com BP-N hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com IS-N aquoso ($p < 0,05$); ^d Significativamente diferente quando comparado com IS-N hidroalcoólica ($p < 0,05$); ^e Significativamente diferente quando comparado com SB-S aquoso ($p < 0,05$); ^f Significativamente diferente quando comparado com SB-S hidroalcoólica ($p < 0,05$).

Analisando as cervejas preparadas em solvente etanólico, a amostra IS-N destacou-se em ambos os ensaios com valores de IC₅₀ de 616,6 ± 6,9 µg/mL (ABTS) e 230,8 ± 4,8 µg/mL (DPPH). A amostra BP-N apresentou valores de IC₅₀ de 779,8 ± 13,2 µg/mL (ABTS) e 542,9 ± 5,0 µg/mL (DPPH). Por fim, a amostra SB-S exibiu um valor de IC₅₀ maior no ensaio ABTS (909,2 ± 15,8 µg/mL), contudo obteve um melhor resultado na inibição do radical DPPH (505,2 ± 6,1 µg/mL) em comparação com a amostra BP-N.

De forma geral, as amostras Stout apresentaram melhores resultados, destacando-se a amostra artesanal IS-N. O estudo de Silva *et al.* (2022) analisou, entre outros estilos, o estilo Imperial Stout contendo etanol e relatou uma percentagem de inibição do radical DPPH de 82,2%. Além disso, Marques *et al.* (2017), avaliaram a capacidade antioxidante de quatro cervejas artesanais produzidas em laboratório, incluindo o estilo Brown Porter, através do ensaio DPPH e relataram o maior valor de percentagem de inibição de radicais livres para essa mesma amostra. Rahman *et al.* (2020) investigaram o potencial antioxidante de um conjunto de cervejas, incluindo duas do estilo Stout (uma artesanal e uma industrial, provenientes do Canadá e da Irlanda, respetivamente), através do DPPH e ABTS. Os resultados indicaram que a cerveja artesanal apresentou a maior capacidade antioxidante em ambos os ensaios. Por outro lado, a cerveja industrial foi a segunda amostra em estudo com os melhores resultados de inibição do radical DPPH. Estes resultados vão de encontro com os obtidos, uma vez que a amostra IS-N obteve, de forma geral, melhores resultados em comparação com a amostra SB-S.



A maior capacidade antioxidante observada para as cervejas artesanais em relação às cervejas industriais pode ser explicada por um conjunto de fatores relacionados com o processo de produção, ingredientes usados e à ausência de filtração, que influenciam diretamente a concentração e o perfil fenólico desta bebida (Gouvinhas *et al.*, 2021). As cervejas artesanais são produzidas através de técnicas mais tradicionais, que envolvem recorrentemente o uso de matérias-primas tradicionais ou inovadoras e que não são sujeitas a processos de filtração ou pasteurização (Breda *et al.*, 2022). Por outro lado, as cervejas industriais são fabricadas em larga escala, com ingredientes padrão, geralmente com adição de aditivos, passando recorrentemente por processos de filtração (Jaeger *et al.*, 2020), o que aporta consequências no teor de polifenóis, uma vez que esta etapa reduz significativamente a presença destes compostos (Gouvinhas *et al.*, 2021). Em contraste, as cervejas artesanais, podem reter um maior teor de compostos fenólicos, contudo, o seu teor pode variar dependendo da quantidade e da qualidade das matérias-primas, da região de cultivo e do seu processamento (Breda *et al.*, 2022). Os compostos antioxidantes presentes na cerveja são diversos e pertencem a diferentes classes químicas, nomeadamente, tióis, dióxido de enxofre, produtos da reação de maillard, compostos amargos provenientes do lúpulo, como α -ácidos, bem como substâncias fenólicas derivadas do malte e do lúpulo (Wannenmacher *et al.*, 2019).



5. Conclusão

Atualmente é possível observar no mercado uma grande variedade de cervejas artesanais, elaboradas com diferentes matérias-primas (maltes e lúpulos), leveduras e até mesmo processos tecnológicos que podem influenciar o seu teor de compostos ativos (vitaminas, minerais, fitoquímicos).

Face ao elevado TPC presente nas cervejas artesanais e nas suas matérias-primas (malte e lúpulo), esta bebida poderá proporcionar benefícios à saúde, em particular devido à sua potencial atividade antioxidante. Assim, tendo em vista os benefícios que os antioxidantes proporcionam à cerveja e à saúde humana, as novas tendências vão no sentido de procurar formas de aumentar o teor de compostos antioxidantes, desenvolvendo cervejas com novas características.

As propriedades antioxidantes e o teor total de fenólicos da cerveja dependem da quantidade e qualidade dos ingredientes iniciais (ex.: malte e lúpulo), e do processo de fabrico da cerveja. Existem vários estudos com foco na evolução dos antioxidantes durante todo o processo de fabrico da cerveja, mas ainda se observam lacunas que precisam de ser investigadas. Sabe-se que o potencial antioxidante do produto final depende das condições de cultivo das matérias-primas utilizadas, entre outros aspetos. Durante o processo de maltagem e fabrico de cerveja, há muitos parâmetros que podem ser influenciados, por exemplo, pela tecnologia utilizada, de forma a otimizar as condições de libertação e retenção dos antioxidantes. No caso dos lúpulos, a utilização de diferentes variedades de lúpulos aromáticos leva à obtenção de cervejas com teores variáveis de compostos fenólicos e potencial antioxidante.

Relativamente ao 1º objetivo do trabalho, é possível concluir que os maltes empregues na produção da cerveja apresentam atividade antioxidante significativa, a qual depende de diversos fatores, como o tipo de cereal, a sua composição química e, principalmente, as condições aplicadas durante o processo de maltagem. Destacam-se as reações de *Maillard*, que ocorrem sobretudo nos maltes especiais e favorecem a formação de melanoidinas, contribuindo para o potencial antioxidante e a estabilidade oxidativa da cerveja juntamente com os compostos fenólicos presentes no malte.

No que diz respeito ao 2º objetivo, comparando as cervejas com as suas matérias-primas, o lúpulo revelou, no geral, uma maior capacidade antioxidante comparativamente ao malte e às cervejas finais. No caso do lúpulo, esta matéria-prima apresentou valores de IC_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$, tanto no extrato aquoso (para a variedade Citra e Saaz), como no extrato hidroalcoólico (para variedade Citra e Mosaic), para o ensaio do DPPH. No caso das cervejas, a IS-N apresentou, no geral, melhores resultados a nível da atividade antioxidante. Uma vez que as matérias-primas apresentaram diferentes valores para a



atividade antioxidante, uma seleção adequada aquando da produção da cerveja, é necessária para obter um produto final com melhor qualidade, e capacidade antioxidante.

Como perspetivas futuras, seria importante alargar este estudo a mais cervejas artesanais disponíveis atualmente no mercado (marcas e estilos diferentes), produzidas em Portugal e noutros países. Seria igualmente relevante fazer uma identificação/caracterização dos compostos ativos presentes nas matérias-primas e cervejas, de forma a poder relacionar os compostos com as potenciais atividades biológicas. Também se destaca a importância da realização de outros ensaios antioxidantes complementares, como FRAP, ORAC, CUPRAC, neutralização do peróxido de hidrogénio e a determinação do TPC. Muitos dos estudos existentes, com análise das atividades biológicas, são essencialmente *in vitro*. Como tal, mais estudos com modelos animais e principalmente ensaios clínicos, com desenhos experimentais adequados são necessários para obter resultados mais conclusivos.

No futuro poderá ser igualmente interessante incorporar extratos vegetais às cervejas finais, que sejam fontes potencialmente ricas em compostos fenólicos e com boas propriedades antioxidantes. Uma nova tendência é usar frutas ou sumos de frutas, que apresentam elevado teor de compostos antioxidantes, e, por isso, quando adicionados à cerveja, o TPC e a atividade antioxidante poderão aumentar.

Uma limitação de muitos compostos de origem natural é a sua baixa absorção e conseqüente biodisponibilidade. Desta forma, é importante ter em consideração o processo de produção da cerveja e as técnicas adotadas no sentido de usar, por exemplo, matérias-primas (ex.: lúpulos) com maior biodisponibilidade, o que resolverá alguns problemas atuais levantados pela má absorção após a administração oral de alguns antioxidantes importantes do lúpulo.



Referências Bibliográficas

- 686 mil consumidores de cerveja artesanal: Notícia. (2022). Marktest Grupo .
<https://www.marktest.com/wap/a/n/id-290a.aspx>
- Adetokunboh, A. H., Obilana, A. O., & Jideani, V. A. (2022). Physicochemical Characteristics of Bambara Groundnut Speciality Malts and Extract. *Molecules*, 27(14).
<https://doi.org/10.3390/molecules27144332>
- 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>
- Aljahdali, N., Widehem, P. G., Anton, P. M., & Carbonero, F. (2020). Gut microbiota modulation by dietary barley malt melanoidins. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010241>
- Allen, K., & Cornforth, D. (2009). Effect of chelating agents and spice-derived antioxidants on myoglobin oxidation in a lipid-free model system. *Journal of Food Science*, 74(5).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01170.x>
- Ambra, R., Pastore, G., & Lucchetti, S. (2021). The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. *Molecules*, 26(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020486>
- 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. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1085, pp. 1–20). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 1829–1856). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Baron, G., Ferrario, G., Marinello, C., Carini, M., Morazzoni, P., & Aldini, G. (2021). Effect of extraction solvent and temperature on polyphenol profiles, antioxidant and anti-inflammatory effects of red grape skin by-product. *Molecules*, 26(18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185454>
- Bartmańska, A., Walecka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., Bania, J., & Huszcza, E. (2018). Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules*, 23(8).
<https://doi.org/10.3390/molecules23082059>



- Bettenhausen, H. M., Barr, L., Broeckling, C. D., Chaparro, J. M., Holbrook, C., Sedin, D., & Heuberger, A. L. (2018). Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. *Food Research International*, *113*, 487–504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.024>
- Bimbo, F., De Meo, E., Baiano, A., & Carlucci, D. (2023). The Value of Craft Beer Styles: Evidence from the Italian Market. *Foods*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/foods12061328>
- Borşa, A., Muntean, M. V., Salanţă, L. C., Tofană, M., Socaci, S. A., Mudura, E., Pop, A., & Pop, C. R. (2022). Effects of Botanical Ingredients Addition on the Bioactive Compounds and Quality of Non-Alcoholic and Craft Beer. In *Plants* (Vol. 11, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11151958>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100473>
- Brewers Association. (2024). *Craft Brewer Definition – Brewers Association*. Brewers Association. <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
- Byeon, Y. S., Hong, Y. S., Kwak, H. S., Lim, S. T., & Kim, S. S. (2022). Metabolite profile and antioxidant potential of wheat (*Triticum aestivum* L.) during malting. *Food Chemistry*, *384*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132443>
- Caban, M., Owczarek, K., Chojnacka, K., Podsedek, A., Sosnowska, D., & Lewandowska, U. (2022). Chemopreventive properties of spent hops (*humulus lupulus* l.) extract against angiogenesis, invasion and migration of colorectal cancer cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *73*(3), 431–442. <https://doi.org/10.26402/jpp.2022.3.11>
- Cai, K., Wu, X., Yue, W., Liu, L., Song, X., Ge, F., Wang, Q., & Wang, J. (2024). Enzyme Activities Shape Malting Quality Standards. *Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4702>
- Carvalho, D. O., Correia, E., Lopes, L., & Guido, L. F. (2014). Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt. *Food Chemistry*, *160*, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.074>
- Casa da Cerveja. (2024). Super Bock Casa Da Cerveja. <https://www.superbockcasadacerveja.pt/>
- Castro, L. F., Affonso, A. D., & Lehman, R. M. (2021). Impact of specialty malts on wort and beer characteristics. *Fermentation*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation7030137>
- Catena, S., Rakotomanomana, N., Zunin, P., Boggia, R., Turrini, F., & Chemat, F. (2020). Solubility study and intensification of extraction of phenolic and anthocyanin compounds from *Oryza*



- sativa L. 'Violet Nori.' *Ultrasonics Sonochemistry*, 68.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105231>
- Censi, R., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Lupidi, G., Angeloni, C., Pruccoli, L., Tarozzi, A., & Di Martino, P. (2021). New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. *Cosmetics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040096>
- Cerveja Artesanal Portuguesa – Lista de Cervejas Artesanais de Portugal. (2019). Cerveja Artesanal Portuguesa. <https://cervejaartesanalportuguesa.pt/cervejas/>
- Cervejeiros de Portugal. (2024). Cervejeiros de Portugal. <https://www.cervejeirosdeportugal.pt/>
- Ciont, C., Epuran, A., Kerezsi, A. D., Coldea, T. E., Mudura, E., Pasqualone, A., Zhao, H., Suharoschi, R., Vriesekoop, F., & Pop, O. L. (2022). Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. In *Foods* (Vol. 11, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11172693>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622>
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. In *Food and Bioprocess Processing* (Vol. 109, pp. 52–73). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- de Lima, A. C., Aceña, L., Mestres, M., & Boqué, R. (2022). An Overview of the Application of Multivariate Analysis to the Evaluation of Beer Sensory Quality and Shelf-Life Stability. In *Foods* (Vol. 11, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11142037>
- De Simone, N., Russo, P., Tufariello, M., Fragasso, M., Solimando, M., Capozzi, V., Grieco, F., & Spano, G. (2021). Autochthonous biological resources for the production of regional craft beers: Exploring possible contributions of cereals, hops, microbes, and other ingredients. In *Foods* (Vol. 10, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10081831>
- Do fabrico ao consumo de cerveja. (2020, December 7). Tecnoalimentar. <http://www.tecnoalimentar.pt/noticias/do-fabrico-ao-consumo-de-cerveja/>
- Farzaneh, V., Ghodsvali, A., Bakhshabadi, H., Zare, Z., & Carvalho, I. S. (2017). The impact of germination time on the some selected parameters through malting process. *International*



- Journal of Biological Macromolecules*, 94, 663–668.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.052>
- Félix-Medina, J. V., Montes-Ávila, J., Gutiérrez-Dorado, R., Morales, F. J., Mesías, M., Quintero-Soto, M. F., & Delgado-Andrade, C. (2024). Exploring Maillard reaction markers and melanoidins to investigate toxicological and antioxidant profiles of optimized expanded snacks from corn/common bean mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.13730>
- Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In *Antioxidants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- González-Salitre, L., Guillermo González-Olivares, L., & Antobelli Basilio-Cortes, U. (2023). Humulus lupulus L. a potential precursor to human health: High hops craft beer. In *Food Chemistry* (Vol. 405). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134959>
- Gouvinhas, I., Breda, C., & Barros, A. I. (2021). Characterization and discrimination of commercial portuguese beers based on phenolic composition and antioxidant capacity. *Foods*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/foods10051144>
- Gulcin, I., & Alwasel, S. H. (2022). Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method. In *Processes* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>
- Hikmawanti, N. P. E., Fatmawati, S., & Asri, A. W. (2021). The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) leaves extracts. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 755(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012060>
- Hop Breeding Company - Leading the Hop Research Industry. (2024). Hop Breeding Company. <https://www.hopbreeding.com/>
- Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. da C., & Padilha, F. F. (2019). Beer molecules and its sensory and biological properties: A review. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081568>
- Idehen, E., Tang, Y., & Sang, S. (2017). Bioactive phytochemicals in barley. In *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 25, Issue 1, pp. 148–161). Elsevier Taiwan LLC. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.08.002>



- Inui, T., Okumura, K., Matsui, H., Hosoya, T., & Kumazawa, S. (2017). Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols. *Food Chemistry*, *225*, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.002>
- Jaeger, S. R., Worch, T., Phelps, T., Jin, D., & Cardello, A. V. (2020). Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. traditional-style flavor preferences. *Food Quality and Preference*, *82*. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103884>
- Jesús Callejo, M., Tesfaye, W., Carmen González, M., & Morata, A. (2020). Craft Beers: Current Situation and Future Trends. In *New Advances on Fermentation Processes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90006>
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., & Čavar Zeljković, S. (2021). Influence of extraction solvent on the phenolic profile and bioactivity of two achillea species. *Molecules*, *26*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>
- Koller, H., & Perkins, L. B. (2022). Brewing and the Chemical Composition of Amine-Containing Compounds in Beer: A Review. In *Foods* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11030257>
- Koren, D., Kun, S., Hegyesné Vecseri, B., & Kun-Farkas, G. (2019). Study of antioxidant activity during the malting and brewing process. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(8), 3801–3809. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03851-1>
- Kuete, V., & Efferth, T. (2010). Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology*, *OCT*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00123>
- Kunz, T., Frenzel, J., Wietstock, P. C., & Methner, F. J. (2014). Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. *Journal of the Institute of Brewing*, *120*(4), 415–425. <https://doi.org/10.1002/jib.162>
- Lacko-Bartošová, M., Lacko-Bartošová, L., Kobida, Ľ., Kaur, A., & Moudrý, J. (2023). Phenolic Acids Profiles and Phenolic Concentrations of Emmer Cultivars in Response to Growing Year under Organic Management. *Foods*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/foods12071480>
- Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Miesch, L., Holder, E., Miesch, M., & Ennahar, S. (2012). Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of Cereal Science*, *55*(3), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.01.002>



- Li, Y., Dalabasmaz, S., Gensberger-Reigl, S., Heymich, M. L., Krofta, K., & Pischetsrieder, M. (2023). Identification of colupulone and lupulone as the main contributors to the antibacterial activity of hop extracts using activity-guided fractionation and metabolome analysis. *Food Research International*, *169*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112832>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. In *Molecules* (Vol. 19, Issue 11, pp. 19180–19208). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Liguori, L., De Francesco, G., Orilio, P., Perretti, G., & Albanese, D. (2021). Influence of malt composition on the quality of a top fermented beer. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(6), 2295–2303. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04740-8>
- Liu, M., Hansen, P. E., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., Qian, Z., Yang, M., & Miao, J. (2015). Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). In *Molecules* (Vol. 20, Issue 1, pp. 754–779). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules20010754>
- Lu, J., Zhao, H., Chen, J., Fan, W., Dong, J., Kong, W., Sun, J., Cao, Y., & Cai, G. (2007). Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 10994–11001. <https://doi.org/10.1021/jf0722710>
- Lyu, J. I., Ryu, J., Seo, K. S., Kang, K. Y., Park, S. H., Ha, T. H., Ahn, J. W., & Kang, S. Y. (2022). Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts. *Plants*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010135>
- Marques, C., Dinis, L., Barreiros Mota, I., Morais, J., Ismael, S., Pereira-Leal, J. B., Cardoso, J., Ribeiro, P., Beato, H., Resende, M., Espírito Santo, C., Cortez, A. P., Rosário, A., Pestana, D., Teixeira, D., Faria, A., & Calhau, C. (2022). Impact of Beer and Nonalcoholic Beer Consumption on the Gut Microbiota: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(41), 13062–13070. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00587>
- 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>
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>



- Miller', N. J., Rice–Evans, C., Davies², M. 1, Gopinathan', V., & Milner', A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. In *Clinical Science* (Vol. 84).
- Moura–Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D. Da, De Aguiar, P. F., Monteiro, M., Perrone, D., & Torres, A. G. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *199*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Najman, K., Sadowska, A., Wolińska, M., Starczewska, K., & Buczak, K. (2023). The Content of Bioactive Compounds and Technological Properties of Matcha Green Tea and Its Application in the Design of Functional Beverages. *Molecules*, *28*(20). <https://doi.org/10.3390/molecules28207018>
- Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. In *Food Research International* (Vol. 131). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109003>
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 23, pp. 173–182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Pereira, M. J., Santos, D., Cruz, A., Jesus, Â., Martins, J. P., Moreira, F., Santos, M., Pinho, C., & Oliveira, A. I. (2025). Exploring Alternative Potentialities of Portuguese and Spanish Craft Beers: Antioxidant and Photoprotective Activities. *Beverages*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/beverages11010011>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103162>
- Pinto, C., Duque, A. L., Rodríguez–Galdón, B., Cestero, J. J., & Macías, P. (2012). Xanthohumol prevents carbon tetrachloride–induced acute liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3405–3412. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.035>
- Plazar, J., Žegura, B., Lah, T. T., & Filipič, M. (2007). Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2–amino–3–methylimidazo[4,5–f]quinoline (IQ) and



- tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 632(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.03.013>
- Portaria n.º 91/2022, de 9 de fevereiro, do M. da E. e T. D. e A. (2022). *Diário da República*, 1.ª Série.
- Prado, R., Gastl, M., & Becker, T. (2021). Aroma and color development during the production of specialty malts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4816–4840. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12806>
- Puligundla, P., Mok, C., & Park, S. (2020). Advances in the valorization of spent brewer's yeast. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102350>
- Rahman, M. J., Liang, J., Eskin, N. A. M., Eck, P., & Thiyam-Holländer, U. (2020). Identification of hydroxycinnamic acid derivatives of selected canadian and foreign commercial beer extracts and determination of their antioxidant properties. *LWT*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109021>
- Rana, Md. S., Rayhan, N. M. A., Emon, Md. S. H., Islam, Md. T., Rathry, K., Hasan, Md. M., Islam Mansur, Md. M., Srijon, B. C., Islam, M. S., Ray, A., Rakib, Md. A., Islam, A., Kudrat-E-Zahan, Md., Hossen, Md. F., & Asraf, Md. A. (2024). Antioxidant activity of Schiff base ligands using the DPPH scavenging assay: an updated review. *RSC Advances*, 14(45), 33094–33123. <https://doi.org/10.1039/D4RA04375H>
- Rani, H., & Bhardwaj, R. D. (2021). Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer." In *Journal of Food Science* (Vol. 86, Issue 8, pp. 3322–3340). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15858>
- Rani, J., Dhull, S. B., Rose, P. K., & Kidwai, M. K. (2024). Drug-induced liver injury and anti-hepatotoxic effect of herbal compounds: a metabolic mechanism perspective. *Phytomedicine*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155142>
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2019). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 3, pp. 462–473). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
- Salamon, A., Kowalska, H., Ignaczak, A., Marzec, A., Kowalska, J., & Szafrńska, A. (2023). Characteristics of Oat and Buckwheat Malt Grains for Use in the Production of Fermented Foods. *Foods*, 12(20). <https://doi.org/10.3390/foods12203747>



- Santarelli, V., Neri, L., Carbone, K., Macchioni, V., & Pittia, P. (2022). Use of conventional and innovative technologies for the production of food grade hop extracts: Focus on bioactive compounds and antioxidant activity. *Plants*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010041>
- Schwarz, P., & Li, Y. (2011). *Barley: production, improvement, and uses*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958636.ch15>
- Seo, S. H., Kim, E. J., Park, S. E., Park, D. H., Park, K. M., Na, C. S., & Son, H. S. (2020). GC/MS-based metabolomics study to investigate differential metabolites between ale and lager beers. *Food Bioscience*, *36*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100671>
- Shakoor, A., Zhang, C., Xie, J., & Yang, X. (2022). Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties. In *Food Chemistry* (Vol. 393). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133416>
- 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*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071124>
- Silva, S., Oliveira, A. I., Cruz, A., Oliveira, R. F., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Portuguese Craft Beers and Raw Materials. *Molecules*, *27*(22). <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, *34*, 795–800.
- Tian, W., Zhang, C., Zheng, Q., Hu, S., Yan, W., Yue, L., Chen, Z., Zhang, C., Kong, Q., & Sun, L. (2024). In Silico Screening of Bioactive Peptides in Stout Beer and Analysis of ACE Inhibitory Activity. *Foods*, *13*(13). <https://doi.org/10.3390/foods13131973>
- 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. In *Current Research in Food Science* (Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100477>
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 98–106. <http://www.ipharmsciencia.com>
- Trius-Soler, M., Martínez-Carrasco, P., Tresserra-Rimbau, A., Moreno, J. J., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). Effect of moderate beer consumption (with and without ethanol) on cardiovascular health in postmenopausal women. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *103*(15), 7506–7516. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12826>



- Ualema, N. J. M., dos Santos, L. N., Bogusz, S., & Ferreira, N. R. (2024). From Conventional to Craft Beer: Perception, Source, and Production of Beer Color—A Systematic Review and Bibliometric Analysis. In *Foods* (Vol. 13, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods13182956>
- Verhagen, L. C. (2010). Beer Flavor. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 967–997). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00087-3>
- Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. In *Food Bioscience* (Vol. 45). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101495>
- Vingrys, K., Mathai, M., Ashton, J. F., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., McAinch, A. J., & Donkor, O. N. (2022). The effect of malting on phenolic compounds and radical scavenging activity in grains and breakfast cereals. *Journal of Food Science*, 87(9), 4188–4202. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16271>
- Vivian, A. F., Aoyagui, C. T., de Oliveira, D. N., & Catharino, R. R. (2016). Mass spectrometry for the characterization of brewing process. *Food Research International*, 89, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.008>
- Wannenmacher, J., Cotterchio, C., Schlumberger, M., Reuber, V., Gastl, M., & Becker, T. (2019). Technological influence on sensory stability and antioxidant activity of beers measured by ORAC and FRAP. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6628–6637. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9979>
- World Health Organization. (2018). *Global status report on alcohol and health*.
- Wu, C. N., Sun, L. C., Chu, Y. L., Yu, R. C., Hsieh, C. W., Hsu, H. Y., Hsu, F. C., & Cheng, K. C. (2020). Bioactive compounds with anti-oxidative and anti-inflammatory activities of hop extracts. *Food Chemistry*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127244>
- Wu, G., Lin, H., & Chen, Y. (2025). Improvement of the Structure and Antioxidant Activity of Protein–Polyphenol Complexes in Barley Malts Using Roasting Methods. *Antioxidants*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/antiox14050538>
- Xiang, Z., Liu, L., Xu, Z., Kong, Q., Feng, S., Chen, T., Zhou, L., Yang, H., Xiao, Y., & Ding, C. (2024). Solvent Effects on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Associated with *Camellia polyodonta* Flower Extracts. *ACS Omega*, 9(25), 27192–27203. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c01321>



- Xu, J., Wang, W., & Zhao, Y. (2021). Phenolic compounds in whole grain sorghum and their health benefits. In *Foods* (Vol. 10, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10081921>
- Yang, B., Yin, Y., Liu, C., Zhao, Z., & Guo, M. (2021). Effect of germination time on the compositional, functional and antioxidant properties of whole wheat malt and its end-use evaluation in cookie-making. *Food Chemistry*, 349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129125>
- Young Thomas W. (2024, August 29). *Beer | Definition, History, Types, Brewing Process, & Facts | Britannica*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/topic/beer>
- Zeng, Y., Ahmed, H. G. M. D., Li, X., Yang, L., Pu, X., Yang, X., Yang, T., & Yang, J. (2024). Physiological Mechanisms by Which the Functional Ingredients in Beer Impact Human Health. In *Molecules* (Vol. 29, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules29133110>
- Zhao, H. (2014). Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (pp. 15–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00002-7>
- Zugravu, C. A., Medar, C., Manolescu, L. S. C., & Constantin, C. (2023). Beer and Microbiota: Pathways for a Positive and Healthy Interaction. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu15040844>

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO
FARMÁCIA