

Estudo do *trub* quente, resíduo da produção de cerveja com lúpulo Hersbrucker

Study of hot trub, beer production residue with Hersbrucker hops

RESUMO

Anelize Gobette Vieira
anelizegvieira@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Lilian Tatiani Dusman Tonin
liliandusman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

A produção de cerveja gera três tipos de resíduos sólidos, sendo um deles o *trub* quente. Este resíduo é descartado, contudo é fonte de compostos bioativos, provenientes do malte e lúpulo. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do solvente na extração destes compostos, dentre eles fenólicos totais, flavanoides e antocianinas, bem como determinar o potencial antioxidante dos extratos. A cerveja foi preparada com o lúpulo Hersbrucker. O resíduo foi seco em estufa a 40 °C e os extratos foram preparados com os solventes metanol/água 95:5 e 70:30 e etanol/água 70:30. Os compostos bioativos foram quantificados pelo método colorimétrico e a atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e habilidade quelante de Fe²⁺. Observou-se a influência do solvente na quantificação de fenólicos, sendo o etanol/água 70:30 o mais eficiente. Foram quantificados altos teores de antocianinas e flavonoides, sem se observar a influência do solvente para o último. A maior atividade antioxidante foi observada para o extrato etanol/água 70:30 pelos três métodos testados, demonstrando uma correlação positiva com os teores de fenólicos. Os resultados indicam alta capacidade antioxidante para o resíduo, sugerindo sua aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Extração. Fenólicos. Flavonoides. Antioxidante.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

ABSTRACT

The beer's production generates three types of solid waste, one of which is the hot trub. This residue is discarded, however it is a source of bioactive compounds, derived from malt and hops. The objective of the work was to study the influence of solvent in the extraction of these compounds, among them total phenolics, flavanoids and anthocyanins, and determine their antioxidant potential. The beer was prepared with Hersbrucker hops. The residue was dried in an oven at 40°C and the extracts were prepared with the solvents methanol/water 95:5 and 70:30 and ethanol/water 70:30. The bioactive compounds were quantified by the colorimetric method and antioxidant activity provided by the methods DPPH and ABTS free radicals scavenging and Fe²⁺ chelating ability. The influence of the solvent on the quantification of phenolics was observed, with ethanol/water 70:30 being the most efficient. High levels of anthocyanins and flavonoids were quantified, without affecting the solvent to the latter. The highest antioxidant activity was observed for the ethanol/water 70:30 extract by the three tested methods, showing a positive correlation with the phenolic content. The results indicate a high antioxidant capacity for the residue,



suggesting its application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

KEYWORDS: Extraction. Phenolics. Flavanoids. Antioxidant.

INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida produzida através da fermentação de cereais, dentre eles, o mais popular é a cevada.

Durante o processo cervejeiro, alguns resíduos sólidos são gerados, como o *trub* quente, que é formado após a etapa de fervura, no resfriamento do mosto. O *trub* quente é formado por compostos insolúveis e produtos de condensação de polifenóis do lúpulo (HUIGE, 2006).

O lúpulo apresenta polifenóis e flavonoides em sua composição, estes flavonoides apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral (FESTA et al., 2011; PAN; BECKER; GERHÄUSER, 2005; SUN et al., 2005;), antioxidante, antibacteriana e antiviral (DI SOTTO et al., 2018; GERHAUSER, 2005; MIRANDA et al., 2000).

Compostos com atividade antioxidante são definidos como substâncias que presentes em concentrações menores que as do substrato oxidável, têm capacidade de atrasar ou inibir a oxidação deste. Eles podem agir neutralizando a ação dos radicais livres no organismo ou quelando os íons metálicos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Com o aumento do mercado cervejeiro no Brasil, conseqüentemente há um aumento na produção dos resíduos sólidos, acarretando em impactos no meio ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar a influencia do solvente na extração de fenólicos totais e flavonoides dos resíduos *trub* quente gerados a partir da produção de cerveja artesanal com o lúpulo Hersbrucker e determinar sua capacidade antioxidante, visando sua aplicação em alimentos, medicamentos e cosméticos, como fonte de compostos bioativos antioxidantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cerveja artesanal foi preparada pela professora Lilian Tatiani Dusman Tonin no período de maio a agosto de 2019, em duplicata. Os maltes moídos (4,4 Kg Malte de Trigo e 2,2 Kg Malte Pilsen) foram adicionados a aproximadamente 22 L de água na temperatura de 68 °C e mantidos a 64 °C por 70 minutos com agitação e recirculação. Em seguida, elevou-se a temperatura para 75 °C, mantendo-a por 10 minutos. O primeiro mosto foi reservado. Adicionou-se aos grãos aproximadamente 21 L de água, mantendo sob agitação e recirculação a 75 °C por mais 30 minutos. O segundo mosto foi adicionado junto ao primeiro e mantidos por 60 minutos em fervura. Nesta etapa foi adicionado o lúpulo Hersbrucker na forma de pellets (50,0 g no tempo 60 min e 25,0 g no tempo 5 min). O mosto foi então resfriado, utilizando-se um trocador de calor e submetido a um *whirlpool* para decantação forçada das substâncias em suspensão. Ao atingir 25 °C o mosto foi transferido ao fermentador e o fermento WB-06 foi adicionado.

O resíduo, *trub* quente, foi filtrado utilizando-se uma peneira, para remoção do excesso de líquido e armazenado em geladeira até a secagem, realizada em

estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) na temperatura de 40 °C até seu peso permanecer constante. Após a secagem, o produto desidratado foi triturado e armazenado em geladeira para a realização das análises.

Os extratos foram preparados em duplicata com 1,0000 g do resíduo desidratado com 50,0 mL dos solventes MeOH:H₂O 70:30 (v/v), MeOH:H₂O 95:5 (v/v), EtOH:H₂O 70:30 (v/v), durante 4 horas sob agitação magnética ao abrigo da luz (C = 20 g/L). Foram filtrados a partir da filtração simples, armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A análise de antocianinas e flavonoides amarelos foram determinadas através da metodologia de Francis (1982). Os resultados foram calculados em mg por 100 g⁻¹ de resíduo através das equações 1 e 2.

$$\text{Antocianinas totais} = (\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs}) / 98,2 \quad (1)$$

$$\text{Flavonoides amarelos} = (\text{Fator de diluição} \cdot \text{Abs}) / 76,6 \quad (2)$$

Os compostos fenólicos totais dos extratos do resíduo foram quantificados através da metodologia de Minussi et al. (2003) [10] utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu. Uma curva padrão de ácido gálico foi construída nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 (y = 0,005x + 0,004; R² = 0,999), sendo os resultados expressos em mg EAG 100 g⁻¹ de amostra, onde EAG é o Equivalente em Ácido Gálico.

Para a quantificação dos flavonoides foi utilizada a metodologia de Funari; Ferro (2006). Uma curva padrão de rutina nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 200 mg L⁻¹ foi construída (y = 0,005x - 0,021; R² = 0,995) e os resultados foram expressos em mg de rutina 100 g⁻¹ de amostra.

Para determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, adicionou-se em uma cubeta 1,0 mL de extrato (C = 20 g L⁻¹) e 2,0 mL de da solução do radical DPPH (0,12 mM em MeOH). Após 30 minutos de incubação a absorvância foi lida em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi determinada segundo a metodologia de Rufino et al. (2007). Para ambos os métodos foram utilizados como padrão o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e ácido ascórbico a uma concentração de 0,1 g L⁻¹ e sua atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição em relação ao controle, de acordo com a Equação 3. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%AA = A_{\text{controle}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \cdot A_{\text{controle}}^{-1} \quad (3)$$

Para a determinação da habilidade quelante, foram adicionados a um tubo de ensaio, 3,7 mL do extrato (C = 20 g L⁻¹) e 0,1 mL de FeCl₂ · 4H₂O (0,004 g em 10 mL água deionizada). Foi preparado um controle negativo (A_{cont}), substituindo-se o extrato por MeOH e um controle positivo com 3,7 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,015 g L⁻¹). A primeira leitura (A₀) foi realizada espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 562 nm. Adicionou-se então a esta mistura, 0,2 mL de ferrozina (0,025 g em 10 mL de água deionizada) e depois de 10 minutos a leitura foi realizada novamente no mesmo comprimento de onda (A₁). As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo da porcentagem da habilidade quelante do extrato foi realizado a partir da Equação 4 (HABEYCH et al., 2016).

$$\% \text{ Habilidade quelante} = [A_{\text{cont}} - (A_1 - A_0)] \cdot A_{\text{cont}}^{-1} \quad (4)$$

Os resultados apresentados foram obtidos através da média das repetições \pm desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Stat Soft. Inc. (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *trub* quente foi seco a 40 °C a fim de não degradar seus compostos. A secagem durou em torno de 48 h e com um rendimento de aproximadamente 24%.

Na extração dos compostos fenólicos e flavonoides, a escolha do solvente extrator é um fator muito importante, como pode observar-se na Tabela 1. A água em combinação com outros solventes orgânicos contribui para criar um meio moderadamente polar, o que favorece a extração de polifenóis (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005). De acordo com Kowalczyk et al. (2013), o emprego de solventes hidro alcoólicos favorece a extração de compostos fenólicos, o que justifica a escolha dos três solventes utilizados. O solvente EtOH:H₂O 70:30 foi o mais eficiente na extração de fenóis totais, apresentando um valor superior ao solvente menos eficiente de 38,7%. Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na extração de flavonoides totais para este resíduo.

Tabela 1 - Resultados de fenóis totais e flavonoides totais do *trub* quente Hersbrucker.

Solvente	Fenóis totais mg EAG 100 g ⁻¹	Flavonoides totais mg ERT 100 g ⁻¹
MeOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	151,80 \pm 3,42 ^c	161,81 \pm 1,69 ^a
MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	191,60 \pm 2,68 ^b	151,05 \pm 7,03 ^a
EtOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	247,44 \pm 1,61 ^a	149,99 \pm 2,58 ^a

Fonte: Autoria própria (2020)

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. EAG = equivalente de ácido gálico; ERT = equivalente de rutina.

Dentre os flavonoides estão as antocianinas, cujo interesse é sua capacidade antioxidante, propriedade antiinflamatória, prevenção da hiperglicemia e estimulação da secreção da insulina desta classe de compostos (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004). Os resultados obtidos para a quantificação das antocianinas foram valores relativamente altos para estas classes de compostos, superior inclusive a polpas de fruta estudadas por nosso grupo de pesquisa, como a polpa de noni, que apresentou teores de antocianinas de 1,39 mg 100 g⁻¹ e flavonoides amarelos de 13,01 mg 100 g⁻¹ (PALIOTO et al., 2015) e a polpa da laranjinha-depacu que apresentou valores de 0,65 e 9,63 mg 100 g⁻¹ para antocianinas e flavonoides amarelos, respectivamente (TONIN et al., 2020).

Os resultados de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH, ABTS e Habilidade Quelante do íon Ferro (II) para os extratos do

resíduo estudado e os padrões BHT, ácido ascórbico e EDTA estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das porcentagens de atividade antioxidante (%AA) dos extratos do *trub* quente Hersbrucker e padrões.

Solvente	DPPH	ABTS	Habilidade Quelante
MeOH:H ₂ O 95:5 (v/v)	46,61 ± 0,68 ^b	18,25 ± 0,28 ^b	90,17 ± 0,66 ^b
MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	45,97 ± 0,38 ^b	19,02 ± 0,50 ^b	90,80 ± 0,55 ^b
EtOH:H ₂ O 70:30 (v/v)	75,17 ± 0,66 ^a	22,80 ± 0,31 ^a	96,54 ± 0,20 ^a
Padrão			
BHT	99,45 ± 0,04	98,24 ± 0,04	-
Ácido ascórbico	99,68 ± 0,06	97,73 ± 0,10	-
EDTA	-	-	70,59 ± 1,34

Fonte: Autoria própria (2020)

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. BHT = butil-hidroxi-tolueno.

O método colorimétrico de seqüestro do radical livre DPPH[•] baseia-se no decréscimo da absorbância a 517 nm da solução de DPPH, que sofre redução pelos componentes presentes no extrato e formação do composto difenil-picril-hidrazina, com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). O solvente extrator que melhor apresentou resultado para o método DPPH foi o EtOH:H₂O 70:30. A análise dos resultados de atividade antioxidante dos padrões BHT e ácido ascórbico revelam um valor superior de seqüestro do radical de 25%, demonstrando o potencial antioxidante deste resíduo.

O método de seqüestro do cátion radicalar ABTS^{•+} baseia-se na redução deste por compostos antioxidantes presentes no extrato e formação do ABTS, com redução da absorbância a 734 (RUFINO et al., 2007). O maior potencial antioxidante foi observado para o extrato EtOH:H₂O 70:30. Os padrões BHT e ácido ascórbico apresentaram valores de atividade antioxidante muito superiores, demonstrando a importância destacada por Alves et al. (2010) da escolha do método para avaliar o potencial de antioxidantes naturais.

O método de habilidade quelante do íon Fe²⁺ baseia-se na reação destes íons com a ferrozina, quanto mais os compostos antioxidantes quelarem os íons, menos estarão disponíveis para reagir com a ferrozina e menor será a absorbância a 562 nm (HABEYCH et al., 2016). Compostos antioxidantes que possuem esta habilidade contribuem na quelação de metais de transição, que em excesso podem levar a peroxidação lipídica com conseqüente lesão das membranas plasmáticas e a oxidação do DNA. Mesmo em baixas concentrações o íon Fe²⁺ induz a geração de radicais hidroxila, através da reação de Fenton, causando lesão ou morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Por este método o solvente EtOH:H₂O 70:30 foi o que forneceu maior potencial antioxidante para o *trub* Hersbrucker, 27% superior ao padrão EDTA.

Munekata et al. (2016) identificaram 14 compostos do mesmo extrato de resíduo da suspensão da fervura do mosto cervejeiro, sendo eles flavonoides (derivado da epi-catequina, derivado da epi-galocatequina, derivado da acacetina, quercetina-3-O-glicosídeo e catequina glicosilada, prodelfinidina B3), ácidos fenólicos (ácido cafeicohexosídeo e derivado do ácido siríngico) e os ácidos amargos (derivados da lupulona, cohumulona e humulona), podendo-se sugerir a presença de alguns destes compostos nos *trubs* quente estudados, visto o potencial antioxidante que apresentaram pelos métodos testados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram alto potencial antioxidante para o resíduo cervejeiro estudado, apresentando uma correlação positiva com o conteúdo de fenóis totais e flavonoides. O solvente EtOH:H₂O 70:30 foi o mais eficiente na extração dos compostos bioativos antioxidantes. Observou-se ainda um conteúdo de antocianinas e flavonoides amarelos relativamente altos. O *trub* quente obtido a partir do lúpulo Hersbrucker é fonte de compostos bioativos que podem ser aplicados nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR Câmpus Apucarana (LAMAP).

REFERÊNCIAS

- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, **LWT-Food Science Technology**, v. 22, p 25-30, 1995.
- DI SOTTO, A.; CHECCONI, P.; CELESTINO, I.; LOCATELLI, M.; CARISSIMI, S.; DE ANGELIS, M.; ROSSI, V.; LIMONGI, D.; TONIOLO, C.; MARTINOLI, L.; DI GIACOMO, S.; PALAMARA, A.T.; NENCIONI, L. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydro alcoholic Extract from *Humulus lupulus* L, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-14, 2018.
- FESTA, M.; CAPASSO, A.; D'ACUNTO, C.W.; MASULLO, M.; ROSSI, A.G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways, **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2505–2513, 2011.

FRANCIS, F. J. **Analysis of anthocyanins**, In: Anthocyanins as food colors, New York: Academic Press, p. 181-207, 1982.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171–178, 2006.

GERHAUSER, C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites, **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 827–831, 2005.

HABEYCH, E.; KOGELNBERG V.; SAGALOWICZ, L.; MICHEL, M.; GALAFFU, N. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iron, **Food Research International**, v. 88, p. 122-128, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3^a ed, Oxford University Press: New York, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-55, 2004.

HUIGE, N. Brewery by-products and effluents. **Handbook of Brewing**. 2^a ed., Taylor & Francis Group: Boca Raton, USA, p. 656-707, 2006.

KOWALCZYK, D.; SWIECA, M.; CICHOKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydro alcoholic extracts of hops and their pellets, **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103-110, 2013.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extract prepared from plant by products using different solvents and extraction time, **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MINUSSI, R. C; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, **Food Chemical**, v. 82, p. 409-416, 2003.

MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and non prenylated chalcones and flavanones *in vitro*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3876–3884, 2000.

MUNEKATA, P. E. S.; FRANCO, D.; TRINDADE, M. A.; LORENZO, J. M. Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. **LWT– Food Science and Technology**, v. 68, p. 52-58, 2016.

PALIOTO, G. F.; SILVA, C. F. G.; MENDES, M. P.; ALMEIDA, V. V., ROCHA, C. L. M. S. C.; TONIN, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p. 59-66, 2015.

PAN, L.; BECKER, H.; GERHÄUSER, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon câncer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway, **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 837–843, 2005.

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1-4, 2007.

SUN, Z.; ZHOU, C.; LIU, F.; ZHANG, W.; CHEN, J.; PAN, Y.; MA, L.; LIU, Q.; DU, Y.; YANG, J.; WANG, Q. Inhibition of breast câncer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway *in vivo* and *in vitro*, **Oncology Letters**, v. 15, n.1, p. 908–916, 2018.

TONIN, L. T. D.; TEIXEIRA, B. S.; SUZUKI, R. M. Capacidade antioxidante e compostos bioativos dos frutos de *Pouteria glomerata* (Laranjinha-de-pacu). **Revista Tecnológica**, v. 29, p. 291-308, 2020.