

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Caracterização fenólica e determinação da atividade antioxidante de cervejas
portuguesas**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade Alimentar

Lucinda Margarida Oliveira de Sousa

Prof^ª. Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim Barros
Doutora Irene Gouvinhas



Vila Real, 2019

Orientadora

(Professora Doutora Ana Barros)
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Co-orientadora

(Doutora Irene Gouvinhas)
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Direção de Curso

(Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro)

A experiência é o nome que damos aos nossos erros.

Óscar Wilde

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para este estudo.

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Doutora Ana Barros, para quem não há agradecimentos que cheguem. As notas dominantes da sua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata pela liberdade de ação que me permitiu, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

À minha coorientadora, Doutora Irene, pela sua disponibilidade irrestrita, a sua forma exigente, crítica e criativa que facilitaram o alcance dos objetivos propostos nesta dissertação.

A todos os colegas do laboratório, pela amizade, companheirismo e pelo contributo e auxílio na elaboração do presente estudo, na ajuda com os equipamentos e dúvidas que surgiram ao longo do meu trabalho.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

Ao meu namorado, agradeço todo o seu amor, atenção e presença incansável com que me apoiou ao longo do período da elaboração desta dissertação.

À minha irmã, que apesar de me chatear muito a cabeça e me irritar, sei que está sempre a torcer por mim e pronta a ajudar.

Aos meus avós por cuidarem sempre de mim, darem os melhores conselhos e acreditarem que seria sempre capaz de alcançar os meus objetivos.

Finalmente aos meus pais, pela força e pelo carinho que sempre prestaram ao longo de toda a minha vida académica, sem eles teria sido impossível a continuidade nos estudos até à chegada deste mestrado, os meus eternos agradecimentos.

A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos, por tornarem esta dissertação uma realidade.

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais apreciadas e consumidas a nível mundial. Os variados estilos de cerveja existentes baseiam-se em conjugações de ingredientes, processamento e fatores culturais. Porém, a diferenciação entre estilos de cerveja é maioritariamente originada por variações a nível do substrato (mosto) em detrimento de variações decorrentes da fermentação.

Apesar da levedura desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento sensorial da cerveja, a fermentação de cerveja é levada a cabo por uma variedade limitada de estirpes de leveduras, sendo estas, na sua maioria, pertencentes ao género *Saccharomyces*. A cerveja é considerada um alimento com potenciais efeitos benéficos para a saúde, devido aos seus compostos fenólicos com propriedade antioxidante.

Este estudo teve como principal objetivo a avaliação da atividade antioxidante de 23 cervejas selecionadas resultantes de diferentes tipos de fermentação e de diferentes marcas, comercializadas nos super e hipermercados nacionais, assim como a determinação da sua composição fenólica, nomeadamente o teor polifenólico total pelo método de Folin-Ciocalteu, o teor de *orto*-difenóis e de flavonoides das 23 cervejas selecionadas. A identificação dos compostos fenólicos foi ainda efetuada por HPLC-DAD.

Relativamente ao teor em *orto*-difenóis, a “cerveja 7 branca” revelou ser a cerveja com maior teor ($1,801 \pm 0,087$ g AG/L), já relativamente aos flavonoides e fenóis totais, os resultados revelaram que a “cerveja 2 preta” apresentava uma maior concentração, com um teor de $0,151 \pm 0,017$ g CAT/L e $0,824 \pm 0,074$ g AG/L, respetivamente.

Relativamente à quantificação dos compostos fenólicos por HPLC em cada cerveja, o composto presente maioritariamente foi o ácido gálico, pertencente à classe dos não-flavonoides, estando presente em todas as cervejas, com exceção da “cerveja 5 branca”. Foi ainda possível identificar compostos fenólicos do grupo dos flavonoides, tal como a galocatequina que está presente em todas as amostras, com a exceção da “cerveja 2 preta”, além da presença de ácidos fenólicos, como o caféico, vanílico e ferúlico.

Pela análise de *clusters*, verificou-se que as cervejas se agruparam em 5 *clusters* de acordo com as suas características, composição fenólica e atividade anti-radicalar, para a análise de componentes principais.

Deste modo, pode-se concluir que as cervejas pretas foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante e maior teor em compostos fenólicos. Tais substâncias fazem com que

a cerveja adquira um potencial antioxidante que apresenta benefícios à saúde de quem a consome, indiferentemente da marca, já que todas apresentaram semelhante padrão de compostos (fenólicos), podendo assim desprover principalmente de ação anti-ateroscleróticas, anti-inflamatórias e anti-carcinogénicas.

Palavras-chave: atividade antioxidante, cerveja, compostos fenólicos, fenóis totais, flavonoides, *orto*-difenóis.

ABSTRACT

Beer is one of the most appreciated and consumed drinks worldwide. The varied styles of beer are based on a combination of ingredients, processing and cultural factors. However, the differentiation between styles of beer is mainly caused by variations in the substrate level (must) to the detriment of variations arising from fermentation.

Although the yeast plays a key role in the sensory development of beer, beer fermentation is accomplished by a limited variety of yeast strains, which are mostly belonging to the genus *Saccharomyces*. Beer is considered a food with potential beneficial health effects due to its phenolic compounds with antioxidant property.

This study aimed to evaluate the antioxidant activity from different beer fermentation types and different brands sold in national supermarkets, as well as the phenolic composition, namely the total phenolic content by the Folin-Ciocalteu method, the *ortho*-diphenols content and flavonoids, of 23 beers selected. Furthermore, the identification of phenolic compounds was performed by HPLC-DAD.

Relatively to the content of *ortho*-diphenols, the "white 7 beer" revealed to be the beer with the higher concentration with $1,801 \pm 0,087$ g AG / L. Regarding the total flavonoids and phenols, the results showed that the "black 2 beer" had a higher concentration, with a content of $0,151 \pm 0,017$ g CAT / L and $0,824 \pm 0,074$ g AG / L, respectively.

For the quantification of the phenolic compounds by HPLC, the main compound identified was gallic acid, being present in all beers, except for the "white 5 beer". It was also possible to identify phenolic compounds from the group of flavonoids, besides the presence of phenolic acids, such as coffee, vanillic and ferulic.

By the Cluster analysis, it was possible to verify that the beers were grouped in 5 clusters according to their characteristics, phenolic composition and anti-radical activity, for the analysis of main components.

In this way, we can conclude that the black beers were those that presented greater antioxidant capacity and greater concentration of phenolic compounds. These substances are responsible for the antioxidant potential of beers, presenting benefits to the health of those who consume it, independently to the brand, since all the beers studied presented a similar pattern of compounds (phenolics), thus being able to deprove mainly anti-atherosclerotic, anti-inflammatory and anti-carcinogenic action.

Keywords: antioxidant activity, beer, flavonoids, *ortho*-diphenols, phenolic compounds, total phenols.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA	XII
1. Enquadramento temático	3
1.1. Definição e história da cerveja	3
1.2. Cerveja e saúde	4
1.3. Matérias-primas da cerveja	5
1.4. Estilos de cerveja	12
1.5. Classificação das cervejas	14
1.6. Processo de fabrico da cerveja	14
1.7. Compostos fenólicos presentes na cerveja	15
1.8. Objetivos	17
2. Material e métodos	19
2.1. Amostragem	19
2.2. Preparação das amostras	21
2.3. Determinação da composição fenólica	22
2.3.1. Orto-difenóis	22
2.3.2. Fenóis totais	23
2.3.3. Flavonoides	24
2.4. Atividade antioxidante	25
2.4.1. Capacidade de neutralização do radical DPPH•	26
2.4.2. Capacidade de neutralização do radical ABTS•+	27
2.5. Identificação dos compostos fenólicos presentes nas cervejas por HPLC	30

2.6. Análise estatística	32
3. Resultados e discussão	35
3.1. Composição fenólica e atividade antioxidante das cervejas.....	35
3.2. Identificação dos compostos fenólicos existentes nas cervejas por HPLC ...	39
3.3. Análises estatísticas	47
3.3.1. Análise de componentes principais (ACP).....	47
4. Conclusões.....	53
5. Bibliografia	57
ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Matérias-primas da cerveja.....	5
Figura 2: Diferenças entre os dois tipos de cerveja (Ale e Lager).....	9
Figura 3: Fluxograma de produção de cerveja.....	15
Figura 4: Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados na cerveja ...	16
Figura 5: Microplaca com a curva-padrão dos orto-difenóis e amostras.	23
Figura 6: Microplaca da curva-padrão dos fenóis totais e amostras.	24
Figura 7: Microplaca com a curva-padrão dos flavonóides e amostras	25
Figura 8: Mecanismo de redução do DPPH•	26
Figura 9: Microplaca com a curva-padrão do DPPH e amostras.....	27
Figura 10: Mecanismo de redução do ABTS•+	28
Figura 11: Microplaca com a curva-padrão do ABTS e amostras.....	29
Figura 12: Equipamento HPLC-DAD (Thermo Finnigan Surveyor)	30
Figura 13: Amostras de cerveja colocadas nos <i>vials</i> para realização do HPLC-DAD.	31
Figura 14: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 16 limão” (deteção a 280 nm).	40
Figura 15: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 16 limão” (deteção a 330 nm).	41
Figura 16: Gráfico de dispersão simples (componente principal 1 x componente principal 2) sobre as principais fontes variabilidade das cervejas.	47
Figura 17: Projeção dos valores obtidos para os CP's 1 e 2 para as diferentes amostras.	48
Figura 18: Agrupamento resultante da análise de <i>clusters</i> , diferentes cores referem-se a grupos distintos.	49
Figura 19: Dendrograma para as cervejas obtido pela análise hierárquica de agrupamentos	49
Figura 20: Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar o conteúdo em <i>orto</i> -difenóis.	61
Figura 21: Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar a composição em fenóis totais.	61
Figura 22: Curvas de calibração de catequina, utilizada para determinar o conteúdo em flavonoides.....	62

Figura 23: Curvas de calibração de catequina, utilizada para determinar o conteúdo em flavonoides.....	62
Figura 24: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH)	63
Figura 25: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH)	63
Figura 26: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (ABTS).	64
Figura 27: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (ABTS).	64
Figura 28: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (deteção a 280 nm)..	65
Figura 29: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (deteção a 330 nm)	65
Figura 30: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (deteção a 520 nm)	66
Figura 31: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 3 preta” (deteção a 280 nm).	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estilos de cerveja clássicos.....	12
Tabela 2: Composição das cervejas analisadas.....	19
Tabela 3: Gradiente usado na análise por HPLC-DAD.....	30
Tabela 4: Resultados da avaliação da composição de polifenóis das amostras de cerveja.....	36
Tabela 5: Resultados da atividade antioxidante das amostras de cerveja.....	38
Tabela 6: Quantificação dos compostos fenólicos em cada cerveja (classe dos não flavonoides).	42
Tabela 7: Quantificação dos compostos fenólicos em cada cerveja (classe dos flavonoides).	43
Tabela 8: Peso de cada variável para os componentes principais.....	50
Tabela 9: Teste do coeficiente de correlação de Pearson (r).	51
Tabela 10: Percentagem de variabilidade descrita por cada componente principal.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ABV – Volume alcoólico da cerveja

ACP – Análise de componentes Principais

°C – Grau célsio

CAT – Catequina

DAD – Detetor de díodos (diode array detector)

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

E150c – Caramelo de amónia

E330 – Ácido cítrico

E405 – Alginato de propilenoglicol

FD – Fator diluição

g – Grama

AG – Ácido gálico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

TEAC – Capacidade antioxidante equivalentes trolox

mg – Miligrama

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanómetro

pH – Potencial hidrogeniónico

ROO[·] – Potencial hidroxilo

Trolox – Ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

CAPÍTULO I-INTRODUÇÃO

1. Enquadramento temático

1.1. Definição e história da cerveja

A denominação *cerevisia* ou *cervisia*, a mais próxima da que se conhece atualmente a cerveja, é o nome latino dado pelos gauleses à bebida feita com malte de cevada e de cereais, em homenagem à Ceres, deusa da colheita e da fertilidade (Morado, 2009).

Segundo a legislação portuguesa, Diário da República nº2/1996 de 3 de janeiro, entende-se por cerveja “a bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável”.

Acredita-se que foi a primeira bebida alcoólica desenvolvida pelo homem, desde o ano 8.000 a.C (Carvalho *et al.* 2006).

A cerveja possui uma complexa mistura de compostos fenólicos, cujo teor varia entre 150 a 350 mg/L. Deste total, mais de 60% é derivado do malte (Cortacero-Ramirez *et al.* 2003).

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. É do conhecimento geral que esta é feita a partir de uma mistura de grãos de cereais, principalmente cevada na forma de malte, lúpulo e leveduras selecionadas. A sua história inicia-se há milhares de anos atrás, sendo difícil precisar com exatidão o momento em que a bebida surgiu pela primeira vez (Eblinger, 2009).

Pensa-se que a origem da cerveja se deva ao facto de o ser humano ter abandonado os seus hábitos nómadas e se ter dedicado à agricultura como principal meio de sustento, o que terá acontecido há cerca de 10.000-15.000 anos na região que se estende desde a Mesopotâmia até ao Egito (Aquarone *et al.* 2001).

Os registos mais antigos de produção de cerveja referem o povo Sumério como os que terão descoberto, por acaso, o processo de fermentação da cevada. Foram capazes de repetir o processo, sendo considerados a primeira cultura civilizada produtora de cerveja. Mais tarde, o povo da Babilónia e os Egípcios enraizaram na sua cultura a produção desta matriz. Existem também evidências arqueológicas que remetem para o aparecimento desta bebida na China, onde estaria a ser produzida uma bebida fermentada a partir de uma mistura de arroz, mel e fruta, no sétimo milénio antes de Cristo (Eblinger, 2009). No entanto, a verdadeira origem da cerveja encontra-se perdida no tempo e ninguém pode afirmar, com rigor, o momento exato em

que a primeira cerveja foi produzida. Com a conquista do Egito pelos Gregos, difundiu-se a este povo a produção de cerveja, que mais tarde também se disseminou pelos Romanos. No entanto, nesta fase de expansão, a cerveja foi considerada como uma bebida menos importante e de carácter inferior ao vinho. Na Idade Média ocorreram grandes desenvolvimentos na técnica de fabrico, tendo assim um grande impacto sobre a cerveja fazendo com que esta adquirisse novamente grande importância. Os monges tentaram melhorar o produto e deram grande importância ao uso do lúpulo, utilizado pela primeira vez pelo povo Germânico (Eblinger, 2009).

Após o período da Idade Média, em que a produção de cerveja sofre um revés, a ocorrência de diversas descobertas e acontecimentos permitiu uma melhoria na técnica e processo de fabrico da cerveja e propagação pelo mundo. Algumas dessas descobertas passam pela invenção da máquina a vapor por James Watt, a descoberta da refrigeração artificial por Carl Linde, o desenvolvimento dos caminhos-de-ferro permitindo assim a expansão deste produto, a invenção do método de pasteurização por Louis Pasteur, e por último a descoberta da levedura de fermentação baixa (7 a 13 °C) por Emil Christian Hansen. De forma natural a cerveja foi-se difundindo pelas sociedades modernas, existindo hoje em dia variados tipos de cerveja e processos industriais capazes de fazer chegar este produto a nossa casa com a melhor qualidade possível (Rodrigues, 2011).

1.2. Cerveja e saúde

Segundo Silva (2005), a cerveja, quando consumida moderadamente, é compatível com uma dieta equilibrada, capaz de proporcionar uma autêntica fonte de nutrientes e fibras solúveis, pois contém importantes vitaminas do complexo B, polifenóis, fosfatos, ácidos orgânicos e nucleicos, presentes no malte e no lúpulo. É no entanto importante enfatizar que os efeitos benéficos são conferidos apenas ao consumo moderado que pode levar a uma vida longa e saudável do que quando ingerida de forma abusiva. Abusar da bebida pode ser prejudicial e está associado a muitos problemas de saúde crónicos, como cancro e hipertensão (Bamforth, 2004; Sierksma & Kok, 2012).

1.3. Matérias-primas da cerveja

Em termos genéricos, a cerveja é produzida a partir de 4 ingredientes essenciais, tal como demonstrado na Figura 1: água, malte, lúpulo e fermento (leveduras).

Os ingredientes mencionados são transversais, em maior ou menor quantidade, a todos os tipos de cerveja. Porém, variações e combinações dessas matérias-primas é prática comum na indústria cervejeira, sendo, aliás, um fator determinante na diferenciação e definição de estilos de cerveja.

Acontece que cada um dos componentes possui diversas variedades e pode ser doseado em diferentes quantidades. Além disso no processo, o tempo e a forma como eles são adicionados também modifica o resultado. É claro que é possível padronizar as suas produções, mas quanto maior é a padronização exigida maior atenção à qualidade dos ingredientes, processo de fabrico e aos equipamentos deve ser dada (Papazian, 2006).



Figura 1: Matérias-primas da cerveja (Fonte:

1.3.1. Água

A água representa cerca de 90% da composição em massa da cerveja e exerce grande influência sobre a qualidade desta (Araújo *et al.* 2003, De Keukelerie, 2000; Dragone *et al.* 2007; Faria, 2008).

Existem dois tipos de água utilizados no fabrico da cerveja: a água cervejeira usada na preparação do malte para a moagem, transferência de produtos em elaboração, lavagem de garrafas, latas e barris, e a água de serviço utilizada em procedimentos, locais e equipamentos

que não entra em contato com o produto. A água deve preencher certos requisitos para que possa ser empregada no fabrico da cerveja (como no caso de qualquer outra bebida) (Taylor, 2006):

- Livre de turbidez. A turbidez é produzida por pequenas partículas em suspensão, que podem ser de natureza orgânica ou inorgânica. Por exemplo: terra, argila, areia e outros minerais. Podem servir com fonte de alimentação de micro-organismos e interferir no processo de desinfecção. Essas partículas são removidas por um processo de separação sólido-líquido chamado filtração;

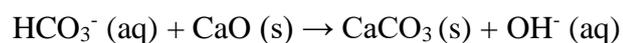
- pH controlado (5 a 9,5). O pH no processo cervejeiro atua diretamente no processo de regulação da atividade enzimática, solubilização de componentes adstringentes, variação da cor e coagulação dos componentes proteicos do mosto (Moll, 1979);

- Padrões microbiológicos. É necessário um plano de higienização e controlo criterioso na unidade industrial que garantam à água todas as características desejadas, nomeadamente: ser insípida, incolor, inodora e livre de microrganismos (Dragone *et al.* 2007; Faria, 2008; Willaert, 2012);

O cálcio é um elemento importante para obter uma cerveja estável e de bom paladar. Protege a amilase da desativação térmica durante a hidrólise do amido (polissacarídeo de fórmula $[C_6H_{10}O_5]_n$) contido no malte; favorece a coagulação proteica durante a fervura do mosto; precipita o oxalato (como CaC_2O_4), evitando a posterior turvação da bebida; estimula o metabolismo e também a floculação da levedura.

O magnésio possui efeito similar ao cálcio, porém em menor intensidade, devido à maior solubilidade do fosfato de magnésio ($Mg_3(PO_4)_2$) em relação ao fosfato de cálcio ($Ca_3(PO_4)_2$). O magnésio é essencial ao funcionamento de certas enzimas da levedura. Níveis acima de 30 mg/L podem conferir um amargor desagradável para a cerveja (Palmer & Kaminski, 2013).

Quando a dureza e alcalinidade da água são elevadas, é necessária a redução desses valores por tratamento à base de óxido de cálcio. Este reage com os hidrogenocarbonatos de cálcio e de magnésio que compõem a dureza da água, formando carbonato de cálcio, que é filtrado:



O zinco, ativa a síntese de proteínas, estimulando o crescimento de leveduras, ativando a fermentação. Contudo, teores superiores a 0,6 mg/L têm ação negativa sobre a fermentação e a estabilidade coloidal (Palmer & Kaminski, 2013).

1.3.2. Malte

Apesar da cerveja permitir a utilização de diversos tipos de cereais (maltados ou não), a cevada (*Hordeum vulgare, vulgare* L.) é insubstituível na sua produção, sendo o cereal ideal por razões sensoriais, tecnológicas e históricas (Oliver, 2011).

O malte é fundamental na produção de cerveja, pois é ele o responsável pela cor e corpo (densidade) da cerveja, atuando também na composição do sabor e aroma. Este é resultante do processo artificial e controlado de germinação (maltagem) da cevada, cereal da família das gramíneas. Comparado com outros cereais, a cevada reúne várias características que justificam a sua utilização na produção de cerveja: maior facilidade no controlo da germinação durante a maltagem; maior poder diastático* comparativamente com outros cereais; nível sensorial superior da cerveja feita a partir de cevada; e casca da cevada atua como agente natural filtrante do mosto (Eblinger & Narzib, 2012).

A razão média de uso é de 200 gramas por litro de cerveja, porém este valor é dependente do rendimento obtido no processo, bem como da qualidade do malte utilizado, sendo este produzido a partir da germinação parcial (interrompida) dos grãos de cereais.

A cevada é geralmente utilizada porque possui um alto teor de proteínas em quantidade suficiente para fornecer os aminoácidos necessários à levedura. O grão de cevada deve ser de tamanho grande e relativamente uniforme e de cor uniformemente clara; deve estar livre de manchas escuras e descoloridas, já que estas são indicativas de ataque de micro-organismos, podendo gerar sabores e odores estranhos; deve ter o mínimo de grãos quebrados e sem casca para aumentar o rendimento da maltagem.

Previamente à utilização da cevada no fabrico de cerveja, esta deve passar por um processo de maltagem. Este pode ser definido como a germinação controlada de cereais com o propósito de alteração física e bioquímica do grão, sendo esta alteração estabilizada através da secagem do grão (Gupta *et al.* 2010).

Este processo é conduzido com o intuito de síntese de enzimas proteolíticas e amilolíticas, modificação da estrutura do grão (tornando-o mais friável e assim mais apto para a moenda) e formação de compostos de *flavour* e de aroma (Bamforth, 2003; Willaert, 2012).

Assim, o processo de maltagem é dividido em cinco etapas (Silva; Faria, 2008):

- 1) A cevada é imersa em água até absorver determinado teor de humidade;
- 2) O grão passa a germinar sob condições controladas;

*Poder diastático: Quantidade de enzimas presentes no malte capazes de converter o amido do grão malteado em açúcar.

- 3) No final faz-se a secagem em duas etapas de temperaturas, o que interrompe o seu crescimento e se obtêm propriedades e características específicas, como claro, escuro, caramelo ou torrado.
- 4) Elimina-se os gomos formados na germinação por um processo chamado de crivagem. Estas radículas são eliminadas pois contêm grande quantidade de proteínas e outras substâncias que podem prejudicar a cerveja. Pode-se também fazer um “polimento” no grão para melhorar a sua aparência.
- 5) O malte é então enviado para os silos de malte, onde ficam armazenados durante um período de aproximadamente 15 dias, para que as transformações bioquímicas consequentes do processo germinativo se completem.

Em todas as etapas há um controlo de temperatura e humidade rigoroso. O cereal maltado, no final do processo, contém:

- Enzimas e amido: Este amido será dividido em açúcares simples pelas enzimas, sendo então utilizados pelas leveduras, em especial para a produção do álcool e dióxido de carbono (CO₂);
- Compostos organoléticos que reagem com o processo de fabrico da cerveja e as leveduras utilizadas para promover o perfil organolético da cerveja;
- A cor da cerveja (função da intensidade da reação de Maillard produzida durante a secagem);
- Proteínas, uma parte será dividida pelas enzimas para ajudar no crescimento das leveduras, outra parte permanece na cerveja para dar a sua aparência;

Encerra assim o processo fisiológico que define o paladar, o aroma e a cor desejados (Ullrich, 2007).

1.3.3. Levedura

Existem vários tipos de cerveja, sendo as principais diferenças verificadas entre elas a escolha do tipo de fermentação, do malte, lúpulo e água, além das técnicas de fermentação de cada cervejeiro (Figura 2) (Lange *et al.* 1999).

A levedura é responsável pela transformação dos açúcares fermentescíveis presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono, além de outros compostos que irão influenciar o paladar e aroma da cerveja (Russell, 2006).

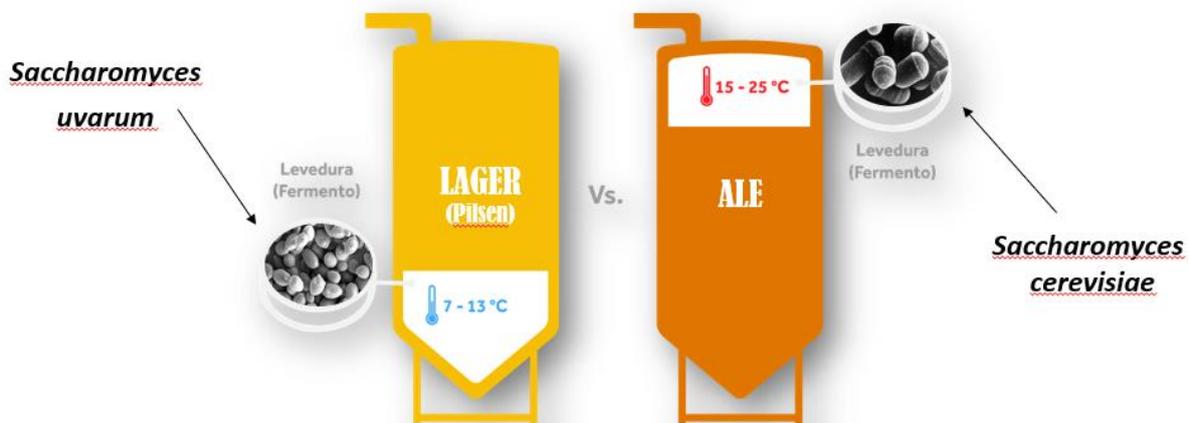


Figura 2: Diferenças entre os dois tipos de cerveja (Ale e Lager) (Adaptado de Matheus Melo, 2015).

Os benefícios da atividade da levedura estendem-se para além do perfil sensorial, pois, devido à produção de etanol e de diversos metabolitos que provocam um decréscimo do valor de pH da cerveja, esta acaba por ser um produto microbiologicamente mais estável (Boulton & Quain, 2008).

A natureza de qualquer bebida alcoólica é determinada não só pela estirpe de levedura utilizada no processo fermentativo, mas também pelo substrato que esta converte (Bamforth, 2003). Assim, a influência da levedura é determinante na qualidade final da cerveja, sendo imperativo além da seleção do género, espécie e estirpe adequada ao estilo de cerveja, garantir a sua viabilidade e inoculação sem contaminação e propiciar um perfil físico-químico do mosto e condições de fermentação ideais para o seu crescimento (Quain, 1986).

Historicamente, a fermentação do mosto da cerveja é levada a cabo por leveduras do género *Saccharomyces*, pertencentes à família Saccharomycetaceae (Eblinger & Narzib, 2012). A espécie e estirpe de levedura utilizada varia consoante o estilo de cerveja, mas, de forma clássica, para estilos de cerveja de baixa fermentação (cervejas fermentadas a baixa temperatura, estilos Lager) são utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces uvarum*, mais conhecidas como *Saccharomyces carlsbergensis*, enquanto as de alta fermentação (cervejas fermentadas a temperatura superior, estilos Ale) recorrem a estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, adotando as leveduras essa mesma designação, leveduras de baixa e alta fermentação (Eblinger & Narzib, 2012).

Esta distinção decorre de diversas características fisiológicas específicas para cada uma delas, tais como: capacidade de floculação, temperatura ótima de crescimento ou capacidade de utilização de certos dissacarídeos (Vidgren, 2010).

A título de exemplo, refira-se que as leveduras de baixa fermentação têm capacidade de fermentar melibiose, fermentam mais eficientemente maltotriose, possuem maior capacidade de floculação e fermentam a temperaturas mais baixas (7-13°C). Já aquelas denominadas de alta fermentação não conseguem fermentar o dissacarídeo mencionado além do seu crescimento ser otimizado a temperaturas mais elevadas (18-25°C) (Russell, 2006).

1.3.4. Lúpulo

O lúpulo utilizado no fabrico da cerveja é a flor seca da planta fêmea do lúpulo, esta é natural de muitas zonas temperadas da Europa, dos Estados Unidos e da China. Desta planta utilizamos as flores das plantas fêmeas. Esta flor possui um formato de cone e no seu interior encontra-se a lupulina (figura 3).

O lúpulo é considerado o “tempero” da cerveja. Este contribui principalmente para o amargor, aroma e sabor da cerveja. Entretanto o lúpulo também auxilia na retenção da espuma, ajuda na remoção de algumas proteínas indesejadas resultando em uma cerveja mais clara. Possui propriedades bactericidas e é um conservante natural, aumentando a vida de prateleira da cerveja. O uso de lúpulo na fabricação de cerveja remonta a 736 d.C. no sul da Europa Central, o que é relativamente recente na história de 8 mil anos de fabricação de cerveja no mundo (Dragone et al., 2007; Silva; Faria, 2008).

A estabilidade do lúpulo depende de sua variedade, da forma de utilização e das condições de armazenamento. O chamado aroma de queijo é associado ao armazenamento inadequado ou fim do prazo de validade do lúpulo (Araújo et al., 2003; Dragone et al., 2007) e decorre de volatilização de componentes da chamada resina mole e de oxidação química ou biológica de componentes da resina dura.

O lúpulo contém diversas resinas e óleos onde se destacam principalmente uma: o ácido alfa. Este ácido é o responsável pelo amargor da cerveja. Por isso quanto maior o seu percentual, maior o poder de amargor do lúpulo (tabela 1).

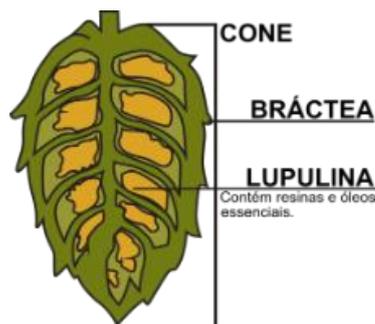


Figura 3: Morfologia da flor de lúpulo.

Se um determinado lúpulo possui 5% de ácido alfa, significa que em 100 gramas, 5 gramas são deste componente. Ou seja, ele é sempre informado como um percentual relativo ao peso do lúpulo, desta maneira é possível dosar corretamente a quantidade de lúpulo.

Tabela 1: Classificação dos lúpulos.

Classificação	Descrição
Amargor	Lúpulos amargos possuem mais ácido alfa. Esses geralmente são utilizados no processo de fervura para extração do amargor.
Aromático	Os lúpulos aromáticos são caracterizados por terem teores de ácidos alfa baixos e um perfil de óleo associado ao bom aroma. Esses lúpulos geralmente são usados como lúpulos de acabamento.
Dual	São lúpulos podem ser utilizados tanto para amargor como para dar aroma a cerveja. Geralmente possuem sua classificação pela ordem de prevalência: amargor/aromático ou aromático/amargor. Esta indicação informa qual é a característica predominante.

Como o ácido alfa não é uma substância solúvel, para extrairmos as propriedades do lúpulo devemos ferve-lo junto com a cerveja. Assim ocorre um processo de isomerização, fixando as resinas na cerveja referentes ao amargor.

Para agregarmos sabores e aromas de lúpulo à cerveja, é necessária a extração dos óleos do lúpulo. Como são substâncias mais voláteis e sujeitas a evaporação, adiciona-se o lúpulo também no final da fervura, para diminuir este efeito. Há também a técnica do “*dry hopping*” onde se coloca o lúpulo por infusão na cerveja já fermentada.

A fim de conservar o lúpulo e suas propriedades, recomenda-se sempre mantê-lo refrigerado (não congelado) com a sua embalagem bem fechada e com o mínimo de ar no seu interior. Isso evita a oxidação e a volatilização dos óleos presentes no lúpulo

1.4. Estilos de cerveja

Os estilos de cerveja encontram-se em constante mudança, estando a definição dos mesmos aberta a interpretação e debate. Diversos fatores participam na mutação perpétua da tipologia das cervejas tais como mudanças tecnológicas, evolução de técnicas, alterações nas matérias-primas ou até a própria percepção do consumidor (Strong & England, 2015).

A distinção mais comum da cerveja baseia-se no tipo de levedura utilizada durante a fermentação (Bamforth, 2003).

As cervejas fermentadas com leveduras de fermentação alta são designadas de Ales, enquanto Lager é a denominação comum para todas aquelas fermentadas com leveduras de baixa fermentação. A partir destas categorias gerais, fatores como o local geográfico de origem e a combinação de matérias-primas utilizadas (maltes e lúpulos) conduzem à ramificação dos estilos de cerveja (Papazian, 2006).

A definição dos estilos de cerveja é então baseada na natureza das matérias-primas, o tipo de levedura utilizado, o país ou região de origem e o processo adotado para a produção (Boulton & Quain, 2008). De igual forma, a definição do estilo não pode ser dissociada do fator histórico, sendo que técnicas e matérias-primas envolvidas na confecção de vários estilos permaneceram inalteradas até hoje (Boulton & Quain, 2008).

Apesar de ser evidente e incontornável a sobreposição de alguns destes fatores em estilos distintos, as variadas combinações existentes resultam em cervejas com características específicas e diferenciadoras.

A tabela 2 resume os estilos mais populares, não tentando, no entanto, albergar todos os estilos de cerveja existentes:

Tabela 2: Estilos de cerveja clássicos. Adaptado de (Boulton & Quain, 2008; Strong & Enlang, 2015)

Estilo de cerveja	Origem	Tipo de fermentação	ABV	Descrição
Pilsner	Boémia (República checa)	Baixa (Lager)	5 %	Lager pálida muito lupulada, produzida com água suave.
Dortmunder	Vestfália (Alemanha)	Baixa (Lager)	5,2 %	Lager de cor dourada, menos lupulada que a Pilsner.
Dunkel	Munique, Baviera (Alemanha)	Baixa (Lager)	4,5-6%	Lager escura, maltada e levemente lupulada.
Bock	Einbeck (Alemanha)	Baixa (Lager)	5,5-7,5%	Cerveja castanho escuro forte, levemente lupulada.

Helles	Munique, Baviera (Alemanha)	Baixa (Lager)	4-6%	Versão mais pálida da Dunkel
Bitter Ale	Reino Unido	Alta (Ale)	3,5-5,5%	Ale amarga de cor pálida acastanhada.
Brown Ale	Reino Unido	Alta (Ale)	3,5-4,5%	Ale adocicada, corpo inteiro e ligeiramente lupulada.
Indian Pale Ale	Reino Unido	Alta (Ale)	5,5-7,5%	Ale fortemente amarga.
Kolsch	Colónia (Alemanha)	Alta (Ale)	4,6%	Ale dourada muito lupulada com paladar ácido/láctico.
Weiss	Baviera (Alemanha)	Alta (Ale)	4-5,6%	Cerveja de trigo ligeiramente lupulada, gosto fenólico.
Lambic	Bruxelas (Bélgica)	Espontânea	5-6,5%	Cerveja azeda.
Gueze	Bruxelas (Bélgica)	Refermentação em garrafa	5-5,5%	Mistura de Lambics novas e envelhecidas. Cerveja seca e frutada.
Porter	Londres (Reino Unido)	Alta (Ale)	6-7%	Ale de cor ruby intensa, feita com água londrina, alta em bicarbonato.
Smoked	Bavaria (Alemanha)	Baixa (Lager)	4,5-7%	Cerveja escura com paladar fumado.
Saison	Valónia (Bélgica)	Alta (Ale)	5,5-6%	Ale de cor âmbar, muito aromática.
Scotch Ale	Escócia (Reino Unido)	Baixa (Lager)	7-10%	Ale castanha escura, fortemente doce, paladar cremoso.
Stout	Reino Unido	Alta (Ale)	4-5%	Cerveja muito escura e muito lupulada.
Trappist	Abadias belgas e holandesas	Alta (Ale)	5-12 %	Cervejas de cor âmbar e castanha, diferentes intensidades aromáticas.

1.5. Classificação das cervejas

As cervejas podem ser classificadas em 5 parâmetros, tais como: fermentação, extrato primitivo, cor, teor alcoólico e teor de extrato (final).

1) Fermentação:

- Alta fermentação
- Baixa fermentação

2) Extrato primitivo:

- Leve: >5% e <10,5%
- Comum: >10,5% e <12%
- Extra: >12% e <14%
- Forte: >14%

3) Cor:

- Clara: menos de 20 unidades EBC (European Brewery Convention)
- Escura: 20 ou mais unidades EBC

4) Teor alcoólico (ABV):

- Sem álcool: menos de 0,5% em volume de álcool
- Com álcool: igual ou maior que 0,5% em volume de álcool

5) Teor de extrato (final):

- Baixo: até 2%
- Médio: 2% a 7%
- Extra: >12,0% e <14%
- Alto: mais de 7%

1.6. Processo de fabrico da cerveja

O processo para a produção de cerveja tem como base científica e tecnológica diversos ramos da ciência, como é o caso da química, bioquímica, microbiologia e da genética. O processo utilizado, já desde os primórdios da humanidade, é de uma complexidade fascinante devido a todas as transformações que ocorrem nas matérias-primas até à obtenção de um produto final, apreciado e consumido pelas mais diversas comunidades do Mundo (Linko *et al.* 1998).

A produção de cerveja (Figura 4) é um exemplo de biotecnologia tradicional, sendo feito sem qualquer contacto manual, e consiste em quatro etapas principais, nomeadamente, brassagem, fermentação e maturação, filtração e envasilhamento (AmBev, 2011; Dragone *et al.* 2007; Silva; Faria, 2008).



Figura 4: Fluxograma de produção de cerveja (Adaptado de:).

1.7. Compostos fenólicos presentes na cerveja

Os compostos fenólicos destacam-se pelas suas diversas propriedades funcionais (Nakamura *et al.* 2012), e desempenham nas cervejas um papel importante quanto às características sensoriais (cor, aroma e sabor) (Gonzalez San José, Muniz e vall Bellés, 2001; Freitas *et al.* 2006)

Possuem grande importância tecnológica nas cervejarias, devido à influência na estabilidade coloidal e capacidade de interação com proteínas, responsáveis pela turbidez. Estes compostos estão diretamente relacionados com a cor, adstringência e nível de oxidação da cerveja, mas são também muito conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes (Martinez *et al.* 2009).

Os principais polifenóis presentes na cerveja (Figura 5) provêm essencialmente da cevada maltada e do lúpulo. Também aparecem compostos mais complexos como os taninos

sendo os mais importantes as proantocianidinas com diversos graus de polimerização (Gonzalez San José, Muniz e Vall Bellés, 2001; Heim Tagliaferro e Dennis, 2002).

Os antioxidantes naturais presentes nas cervejas exercem uma função protetora de qualidade sensorial da cerveja, evitando deterioração oxidativa. O conteúdo final de compostos fenólicos na cerveja não depende exclusivamente das matérias-primas empregues na sua elaboração, mas vários fatores podem afetar este conteúdo final, tais como a etapas de fervura e fermentação (Noel *et al.* 1999).

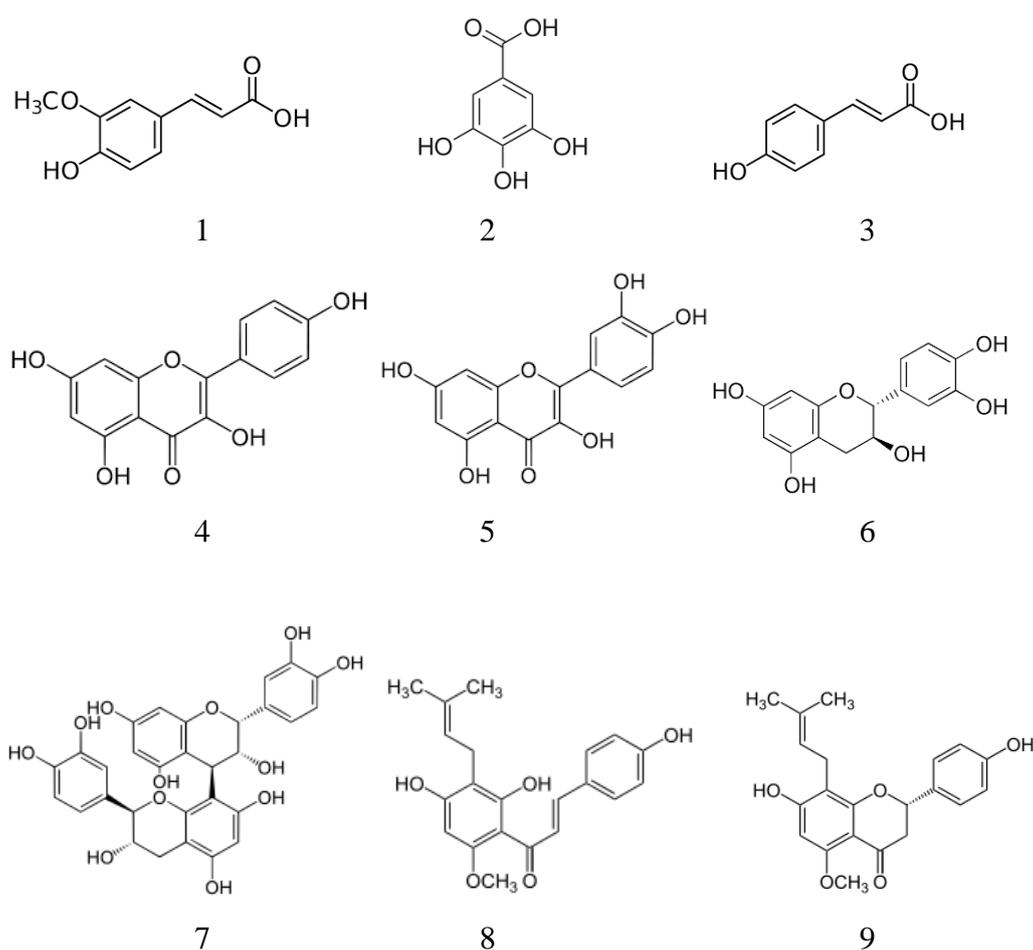


Figura 5: Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados na cerveja.
1- Ácido ferúlico, 2- Ácido gálico, 3- Ácido *p*-cumárico, 4- Kaempferol, 5- Quercetina, 6- Catequina, 7- Procianidina, 8- Xanthohumol, 9- Isoxanthohumol (fonte: Siqueira et al., 2008).

1.8.Objetivos

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas pelos portugueses. Esta pode ser considerada um alimento funcional, sendo benéfico para a saúde do ser humano (em quantidades controladas), dadas as suas características antioxidantes promovidas pela presença de compostos fenólicos.

Assim, os objetivos deste trabalho de investigação foram os seguintes:

- Determinar e quantificar o teor em *orto*-difenóis, fenóis totais e flavonoides de 23 cervejas selecionadas do mercado Português;
- Avaliar a atividade antioxidante através dos métodos DPPH e ABTS;
- Efetuar a caracterização do perfil fenólico das cervejas por HPLC-DAD;
- Correlacionar os parâmetros fenólicos estudados com a atividade antioxidante e com os diferentes tipos de cerveja estudados.

CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

As amostras de cerveja foram selecionadas de entre as marcas portuguesas, havendo amostras de cerveja branca, preta, com álcool, sem álcool e com sabores, sendo estas recolhidas em diferentes hipermercados locais.

Na Tabela 2 é apresentada a composição das 23 cervejas selecionadas, classificadas quanto ao tipo de fermentação, cor, grau alcoólico e componentes base, segundo informações contidas nos rótulos.

Tabela 3: Composição das cervejas analisadas.

Amostra	Categoria	Tipo de fermentação	Cor	Grau alcoólico (% vol.)	Extrato primitivo (° plato)	Componentes base
1	De Abadia	Lager	Preta	6,4	14,6	Água, malte de cevada, cereais não maltados (cevada), açúcar, lúpulo.
2	Preta	Lager	Preta	5,0	12,5	Água, malte de cevada, cereais não maltados (cevada), açúcar, corante: E150c, lúpulo.
3	Preta	Lager	Preta	4,2	10,8	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), açúcar, corante: E150c, xarope de glucose, lúpulo
4	Preta	Lager	Clara	4,1	SI	Água, malte (cevada), cereais não maltados (milho ou arroz), lúpulo
5	Branca	Lager	Clara	5,2	10,85	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), lúpulo.
6	Branca	Lager	Clara	5,1	10,6	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), lúpulo.
7	Branca	Lager	Clara	5,0	SI	Água, Malte de cevada, Milho, cevada e Lúpulo. Contém Cevada
9	Branca	Lager	Clara	5,0	SI	-
10	Branca	Lager	Clara	4,6	SI	-

11	Branca	Lager	Clara	5,0	SI	Água, malte de cevada, milho, lúpulo, cevada, corante: E150c, estabilizador: E405.
12	Branca s/ álcool	Lager	Clara	0,5	6,5	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), aromas, lúpulo.
13	Preta s/ álcool	Lager	Preta	0,5	6,5	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada), dióxido de carbono, corante: E150 C, lúpulo.
14	Limão s/ álcool	Lager	Clara	0,0	SI	50% cerveja sem álcool (alc. 0,03%) (água, malte de cevada, dióxido de carbono e lúpulo), 39,5% água carbonatada, frutose, 4,9% sumos de fruta a base de concentrado (2,7% limão; 1,4% laranja; 0,5% lima; 0,3% acerola), extrato concentrado de limão, aromas naturais, estabilizante: goma de alfarroba
15	Limão	Lager	Clara	2,0	10,8	Água, cerveja (44%) (Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada) e lúpulo), frutose, sumo de fruta à base de concentrado (limão 1,9% laranja 1,8%), estabilizador: pectina, aromas naturais, acidificante: ácido cítrico, extrato de malte de cevada.
16	Limão	Lager	Clara	2,0	SI	Água carbonatada, cerveja (água, malte (cevada), cereais não maltados (milho e cevada), lúpulo), frutose, sumos de fruta de concentrado (limão 2,7%, laranja 1,4%, lima 0,5%, acerola 0,3%), extrato concentrado de limão, aromas naturais, estabilizante: goma de alfarroba.
17	90 (Edição especial)	Lager	Clara	5,0	SI	Água, malte e lúpulos especiais (Styrian, Tettngang e Saaz).
18	Bohemia trigo	Lager	Clara	5,5	SI	Água, malte de cevada, malte de trigo, lúpulo, aromas naturais.

19	Bohemia puro malte	Lager	Clara	6,0	SI	Água, malte de cevada, milho, cevada, Corante: Caramelo e Lúpulo.
20	Bohemia original	Lager	Clara	6,2	SI	Água, Malte de cevada, Milho, cevada, Corante: Caramelo e Lúpulo. Contém Cevada
21	Bohemia IPA	Ale	Clara	7,0	SI	.
22	Frutos vermelhos	Lager	Clara	2,2	SI	Água carbonatada, cerveja (água, malte de cevada, milho, cevada e extrato de lúpulo), xarope de frutose, sumos de fruta a base de concentrado (lima 1,7%, limão 1,6%, mirtilo 0,05% e framboesa 0,05%), concentrado de cenoura purpura, aroma natural, extrato de malte de cevada, extrato concentrado de limão, estabilizador: goma de alfarroba. Contém Cevada.
23	Panaché	Lager	Clara	0,0	SI	Cerveja sem álcool 50% (água, malte de cevada, milho, cevada, xarope de glicose, lúpulo, corante: E150c, estabilizador: E405); Refrigerante aromatizado. Contem edulcorantes 50% (água gaseificada, acidificante E330, aroma, edulcorantes: acessulfame K, sucralose).

SI: Sem informação no rótulo do produto

2.2.Preparação das amostras

A preparação das amostras baseou-se em colocar 50 mL de cada cerveja em copos para ocorrer a desgaseificação total da cerveja, por agitação mecânica, para que não houvesse interferência do gás e da espuma proveniente do fabrico nas análises a executar posteriormente.

Posto isto, as amostras foram colocadas em frascos corretamente etiquetados e armazenados no frigorífico a 4°C até ao momento das análises.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.3. Determinação da composição fenólica

A determinação dos compostos bioativos foi efetuada ao nível do teor em fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis. Todos os métodos foram adaptados e otimizados para a sua utilização em microplacas de 96 poços (Frilabo, Milheirós, Portugal).

2.3.1. *Orto*-difenóis

O teor em *orto*-difenóis foi determinado colorimetricamente pelo método adaptado de Gouvinhas *et al.* (2015). Este método consiste na complexação dos *orto*-difenóis com os iões molibdato, originando uma coloração alaranjada.

Para a elaboração da curva de calibração utilizaram-se oito padrões de ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), com diferentes concentrações: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L, o que permitiu obter uma reta de calibração ($y = 0,0045x + 0,1046$) com $R^2 = 0,9992$ (Anexo 1).

Em cada poço foi adicionado 160 μ L de cada padrão e de cada amostra, seguido de 40 μ L de molibdato de sódio (Na_2MoO_4 , 50g/L). A placa foi deixada a incubar à temperatura ambiente com proteção de luminosidade por 15 minutos. Decorrido este tempo foram efetuadas as leituras de absorvância a 375 nm no espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal).

Procedeu-se de igual forma para cada uma das amostras em triplicado (Figura 5).

Por interpolação, a partir da reta de calibração, foi calculado o conteúdo *em orto*-difenóis. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g/L amostra.

$$\text{Orto} - \text{difenóis (mg AG/g)} = \frac{\text{ABS sample} - b}{a}$$

(Onde: a é o declive da curva padrão ($y = ax + b$) e b é o termo independente da curva padrão.)

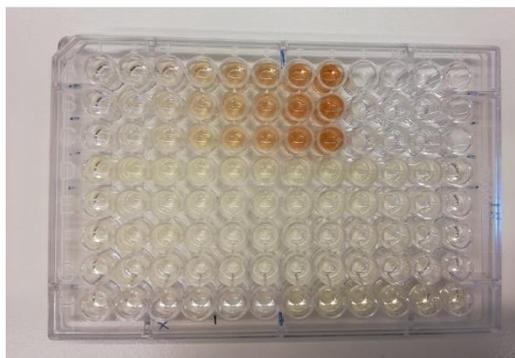


Figura 6: Microplaca com a curva-padrão dos orto-difenóis e amostras.

2.3.2. Fenóis totais

A determinação do teor em fenóis totais das amostras foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu, segundo a metodologia previamente descrita por Sousa *et al.* (2014).

O reagente Folin-Ciocalteu consiste numa mistura dos ácidos fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica. Esta redução resulta na formação de complexos azuis, que podem ser quantificados espectrofotometricamente a 750 nm (Magalhães *et al.* 2006).

Para elaborar a curva de calibração utilizaram-se oito padrões de ácido gálico (250 mg/L), com diferentes concentrações: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L, o que permitiu obter uma reta de calibração: $y = 0,0044x + 0,0628$, com $R^2 = 0,9977$ (Anexo 2).

Em cada poço foram adicionados sequencialmente 20 μL de cada padrão de ácido gálico e de cada amostra, 100 μL de Folin-Ciocalteu previamente diluído em água (1:10 H_2O), 80 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3 : 7,5g/L), completando um volume de reação total de 200 μL .

A placa foi deixada a incubar à temperatura de 40-45°C, com proteção de luminosidade por 30 min.

Decorrido este tempo foram feitas as leituras de absorvância a 750nm num espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal). Procedeu-se de igual forma para cada um dos padrões e das amostras em triplicado (Figura 6).

Por interpolação, a partir da reta de calibração foi calculado o conteúdo em fenóis totais para cada uma das amostras. Os resultados foram expressos em mg ácido gálico por L de amostra.

$$\text{Fenóis totais (mg AG/g)} = \frac{\text{ABS sample} - b}{a}$$

(Onde: a é o declive da curva padrão ($y=ax+b$) e b é o termo independente da curva padrão.)

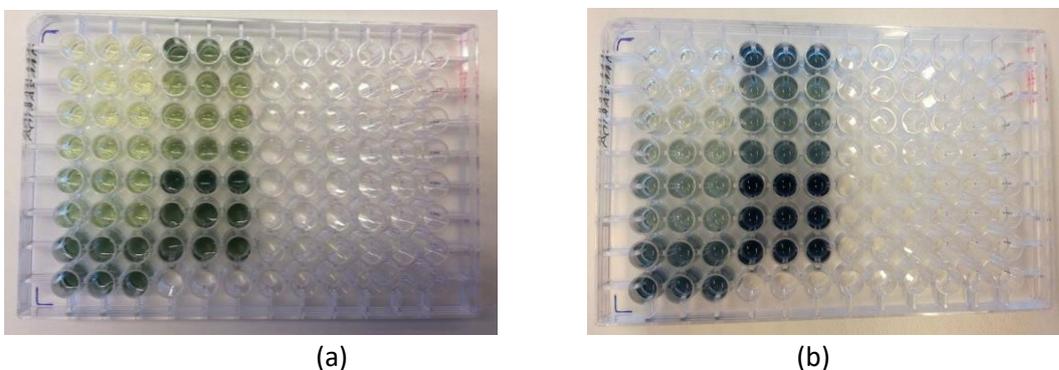


Figura 7: Microplaca da curva-padrão dos fenóis totais e amostras, antes (a) e depois (b) da reação de oxidação entre o anião fenolato e o reagente de Folin.

2.3.3. Flavonoides

Os flavonoides foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Zhishem *et al.* (1999). Para a elaboração da curva de calibração utilizou-se um padrão de catequina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), com diferentes concentrações: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/L, o que permitiu obter retas de calibração ($y = 0,0018x - 0,0455$) com $R^2 = 0,9935$ e ($y = 0,0019x + 0,0457$) com $R^2=0,9904$ (Anexo 3).

Em cada poço adicionou-se sequencialmente 24 μL de cada padrão e de cada amostra seguido de 28 μL de nitrito de sódio (NaNO_2 , 50 g/L)). Após 5 minutos, foram adicionados 28 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3 , 100 g/L). Após 6 minutos 120 μL de hidróxido de sódio (NaOH , 1M).

Foram efetuadas as leituras de absorvância a 510 nm no espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal) com agitação prévia de 30 segundos.

Procedeu-se de igual forma para cada uma das amostras em triplicado (Figura 7).

Por interpolação, a partir da reta de calibração foi calculado o conteúdo em flavonoides para cada uma das amostras. Os resultados foram expressos em mg de catequina por L de amostra.

$$\text{Flavonóides (mg CAT/g)} = \frac{\text{ABS sample} - b}{a}$$

(Onde: a é o declive da curva padrão ($y=ax+b$) e b é o termo independente da curva padrão.)

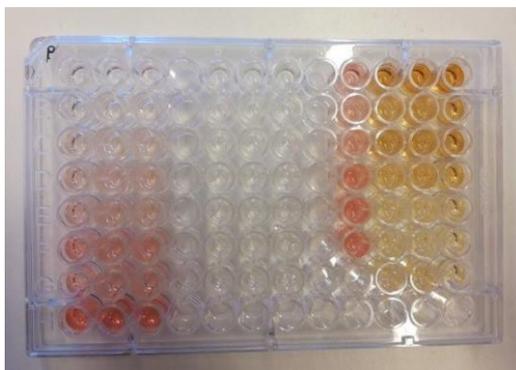


Figura 8: Microplaca com a curva-padrão dos flavonoides e amostras

2.4. Atividade antioxidante

O método utilizado para a determinação da atividade antioxidante foi o método de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox) descrito por Ozgen *et al.* (2006), que envolve reações de transferência de elétrons. Este método permite a quantificação da atividade antioxidante de uma amostra através da sua capacidade em reduzir radicais, esta técnica tem sido amplamente utilizada.

Foram usadas duas metodologias diferentes:

- Determinação da capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•);
- Determinação da capacidade de neutralização do radical ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS•+).

2.4.1. Capacidade de neutralização do radical DPPH•

Para avaliar a capacidade antioxidante, as amostras foram deixadas a reagir com o radical estável DPPH• numa solução de MeOH:H₂O (70:30, v/v) para assim poder avaliar a capacidade anti-radicalar. O DPPH• que possui uma cor púrpura na presença de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•) é reduzido formando 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) que não apresenta coloração (Figura 8) (Huand, D. *et al.*, 2005).

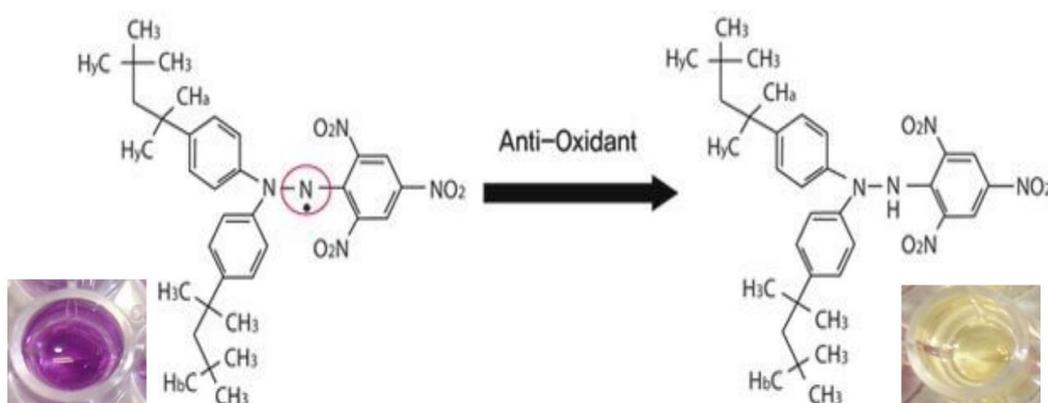


Figura 9: Mecanismo de redução do DPPH•

Através da diluição de 0,5 ml da solução concentrada de DPPH em 26 ml da solução de MeOH:H₂O (70:30, v/v), preparou-se uma solução em que a sua absorvância foi ajustada a 1,000 no comprimento de onda de 520nm.

Para a solução-padrão foi utilizado o trolox, tendo sido preparado por diluição da solução 5 mM em MeOH:H₂O (50:50, v/v), tendo-se obtido uma concentração inicial de 2,5 mM, a partir desta fizeram-se diluições seriadas de 1/2 em MeOH:H₂O (50:50, v/v), obtendo-se assim diferentes concentrações: 0,625; 0,313; 0,156; 0,078 e 0,039 mM, o que permitiu obter uma reta de calibração ($y = 97,844x$) com $R^2 = 0,9972$ e ($y = 69,038x$) com $R^2 = 0,9947$ (Anexo 5). A existência de duas retas é devido a terem sido efetuadas determinações em dias diferentes.

Assim, num poço foi adicionado 190 μ L da solução de DPPH• e 10 μ L de MeOH:H₂O (70:30 v/v) para o branco. A cada poço foi adicionado 190 μ L da solução de DPPH• e 10 μ L de cada padrão de trolox e de cada amostra, perfazendo assim os 200 μ L do volume total de reação. Seguidamente a microplaca foi deixada a incubar por 30 minutos com proteção de luminosidade. Por fim foram efetuadas as leituras de absorvância a 520nm no espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal).

A percentagem de inibição para cada padrão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%inibição amostra = 100 * \frac{Abs\ 520\ branco - Abs\ 520\ amostra}{Abs\ 520\ branco}$$

Onde: Abs520 branco é a absorvância do branco (190 μ L + 10 μ L de metanol/água (70:30 v/v));

Procedeu-se de igual forma para cada uma das amostras em triplicado (Figura 9).

Por interpolação a partir da curva de calibração foi determinada a atividade antioxidante, e os resultados obtidos foram expressos em mmol de Trolox/g de peso seco de amostra.

O TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao trolox) das amostras é calculado da seguinte forma:

$$TEAC\ amostra = \frac{\%inibição}{a}$$

Onde: a é o declive da curva-padrão ($y=ax$)



Figura 10: Microplaca com a curva-padrão do DPPH e amostras.

2.4.2. Capacidade de neutralização do radical ABTS•+

Neste método é adicionado ao ABTS• persulfato de potássio ($Na_2S_2O_8$), que vai oxidar a catião ABTS•+, este possui uma coloração azul-esverdeada escura. Ao adicionar a esta mistura antioxidantes, o catião ABTS•+ é reduzido a ABTS, observando-se assim uma descoloração da solução inicial (Figura 10).

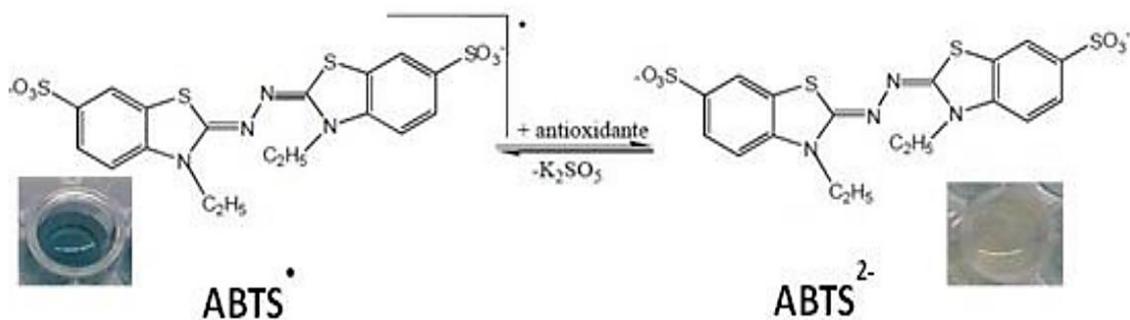


Figura 11: Mecanismo de redução do ABTS^{•+}

Para a realização deste método, preparou-se o catião radical ABTS^{•+} a partir de uma solução de ABTS (7mM) em H₂O destilada e uma solução de persulfato de potássio (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) a 148 mM. De seguida adicionou-se 88 μ L da solução de persulfato de potássio a 5 mL da solução ABTS, deixando esta mistura em repouso durante 12/16h protegida da luz, à temperatura ambiente, para que atinga o estado oxidativo estável. No fim preparou-se a solução de trabalho, através da diluição da solução ABTS^{•+} a 100 mM em tampão de acetato de sódio (pH 4,5) até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm.

Para a solução-padrão foi utilizado o trolox, preparado por diluição da solução 5mM no tampão de acetato de sódio, posto isto a solução foi diluída 1:5 (v/v, no tampão acetato de sódio) originando assim uma solução de trolox com 0,2 mM. A partir desta fizeram-se diluições seriadas de $\frac{1}{2}$ em tampão acetato de sódio, obtendo se assim os seis padrões para a elaboração da curva de calibração com diferentes concentrações: 0,200, 0,140, 0,098, 0,069, 0,048 e 0,034 mM, o que permitiu obter uma reta de calibração ($y = 158,03x$) com $R^2 = 0,9986$ (Anexo 6).

A cada poço foi adicionado sequencialmente 188 μ L da solução de trabalho de ABTS (1mM) e 12 μ L de cada padrão de trolox e de cada amostra para completar um volume total de reação de 200 μ L. Incluiu-se um poço com 188 μ L de ABTS (1mM) + 12 μ L de água destilada para o branco.

Seguidamente a microplaca foi deixada a incubar por 30 minutos com proteção de luminosidade. Por fim, foram efetuadas as leituras de absorvância a 734 nm no espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal).

A percentagem de inibição para cada padrão assim como das amostras estudadas, foi calculada pela fórmula:

$$\%inibição amostra = 100 * \frac{Abs\ 734\ branco - Abs\ 734\ amostra}{Abs\ 734\ branco}$$

Onde se considera Abs734branco a absorvância de 188 μ L de ABTS•+ + 12 μ L água destilada.

Procedeu-se de igual forma para cada uma das amostras em triplicado (figura 11).

Por interpolação a partir da curva de calibração foi determinada a atividade antioxidante das amostras. Os resultados obtidos foram expressos em mmol de Trolox/L de amostra.

$$TEAC_{amostra} = \frac{\%inibição}{a}$$

Onde: a é o declive da curva-padrão ($y=ax$)

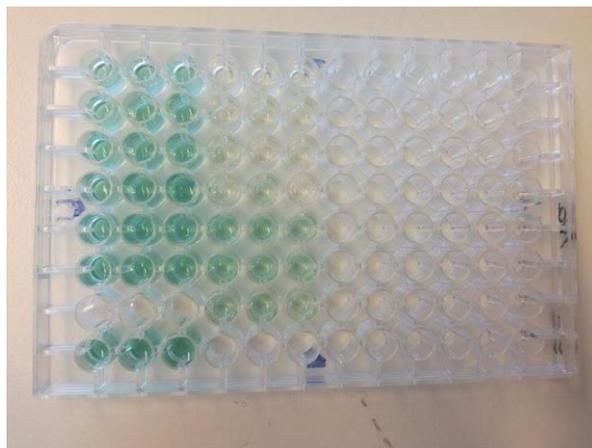


Figura 12: Microplaca com a curva-padrão do ABTS e amostras.

2.5. Identificação dos compostos fenólicos presentes nas cervejas por HPLC

A análise foi efetuada com equipamento Thermo Finnigan Surveyor equipado com um detetor de díodo (figura 12).



Figura 13: Equipamento HPLC-DAD (Thermo Finnigan Surveyor, EUA).

A separação de compostos foi feita com uma coluna ACE UltraCore 5 μ m SuperC18 (250x4,6mm, id) a 25 °C, estando instalada uma pré-coluna com o mesmo tipo de enchimento. As amostras foram injetadas utilizando um loop de 20 μ L. A fase móvel apolar composta pelos solventes A – H₂O:CH₂O₂ (água:ácido fórmico - 99,9:0,1) e solvente B – C₂H₃N:CH₂O₂ (acetonitrilo:ácido fórmico - 99,9:0,1) e uma fase estacionária que está no interior da coluna, com características polares. Uma vez que as fases móveis são apolares, o tempo de retenção dos eluentes apolares será maior que o do eluentes polares, eluindo estes últimos mais rápido.

O programa de eluentes foi aplicado de acordo com o descrito na tabela que se segue abaixo (Tabela 3).

Tabela 4: Gradiente usado na análise por HPLC-DAD

Tempo de análise (min.)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	90	10
40	74	26
70	35	65
71	0	100
75	0	100
76	90	10
85	90	10

A detecção com o DAD foi efetuada entre 200-600nm selecionados de acordo com os compostos a analisar.

A análise foi realizada a 25°C, com um volume de amostra injetado de 20 µL e um fluxo de 1mL/min. As amostras foram injetadas em duplicado (Figura 13).



Figura 14: Amostras de cerveja colocadas nos vials para realização do HPLC-DAD.

Nesta análise foi utilizado um sistema de HPLC Thermo Finnigan Surveyor com bomba quaternária, autosampler e detetor de PDA (*photo diode-array*) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, EUA). Para a identificação dos compostos fenólicos foram usados os padrões e os respectivos tempos de retenção, ordem de eluição, espectros UV e a literatura (Anastasiadi *et al.* 2012; Barros *et al.* 2014; Domínguez-Perles *et al.* 2016).

2.6. Análise estatística

Todos os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão ($n=3$), sendo submetidos por meio do software estatístico IBM SPSS 21.0 à análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 0,05%.

Foi feita também uma análise de correlação entre variáveis utilizando o teste de Pearson. Com o intuito de padronizar as variáveis e agrupá-las quanto as características químicas mais relevantes entre as amostras, foi realizada uma análise multivariada utilizando o teste de ACP (análise de componentes principais).

Este teste estatístico foi realizado utilizando o software Origin Pro 9.1. Foi adicionalmente levada a cabo uma análise através de dendograma, de forma a avaliar a proximidade entre as diferentes amostras, com recurso aos valores obtidos para os componentes principais, sendo a proximidade entre amostras projetada na forma de distância Euclidiana.

Os valores obtidos para os componentes principais foram também aplicados numa análise de *clusters* de forma a avaliar o agrupamento entre as diferentes amostras.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e discussão

3.1. Composição fenólica e atividade antioxidante das cervejas

Um consumo moderado de cerveja pode ser fonte de compostos fenólicos ao ser humano. Estes constituintes presentes em níveis elevados podem transmitir adstringência, amargor e cor aos alimentos, em especial quando os níveis de açúcar são baixos (Haminiuk *et al.* 2011).

Nas tabelas 4 e 5, estão apresentados os resultados que representam as médias das análises feitas às 23 cervejas estudadas em triplicado para os compostos fenólicos (*orto*-difenóis, flavonoides e fenóis totais) e atividade antiradicalar (ABTS e DPPH), respetivamente.

Relativamente ao teor em *orto*-difenóis (Tabela 4), a “cerveja 7 branca” revelou-se a cerveja com uma maior concentração de $1,801 \pm 0,087$ g AG/L, sendo significativamente diferente das outras cervejas ($p < 0,05$); pelo contrário, a cerveja que apresentou menor concentração em *orto*-difenóis foi a “cerveja 8 preta” com $0,074 \pm 0,024$ g AG/L, significativamente diferente das outras amostras. É possível dizer que de um modo geral as cervejas brancas têm mais teor de *orto*-difenóis.

Não foi encontrada literatura científica, nem estudos que tivessem determinado o teor de *orto*-difenóis em cervejas, não havendo desta forma possíveis comparações.

Analisando os flavonoides, os resultados (Tabela 4) revelaram que a “cerveja 2 preta” apresentava uma maior concentração, com um teor de $0,151 \pm 0,017$ g CAT/L, sendo significativamente diferentes das outras amostras; já a cerveja que apresentou menor concentração foi a “cerveja 15 limão”, com $0,020 \pm 0,005$ g CAT/L, não sendo significativamente diferente da amostra “cerveja 23 panaché”.

Rampazzo (2014) obteve um teor de flavonoides no intervalo de 0,049 e 0,220 g CAT/L para cinco cervejas de fermentação tipo ale (alta fermentação), sendo uma delas preta e cinco cervejas de fermentação tipo lager (baixa fermentação), sendo uma delas também preta, correspondendo a teores duas vezes superiores ao presente trabalho, apesar de utilizarem o mesmo método de quantificação, o que indica que esta diferença possa estar relacionada com o tipo de fabrico da cerveja utilizado.

Tabela 5: Resultados da avaliação da composição de polifenóis das amostras de cerveja.

Amostras de cerveja		<i>Orto</i> -difenóis (g AG/L)	Flavonoides (g CAT/L)	Fenóis totais (g AG/L)
1	Abadia	0,401±0,015 ^{efZ}	0,085±0,014 ^{abcdef}	0,706±0,027 ^{gh}
2	Preta	1,552±0,142 ^h	0,151±0,017 ^f	0,824±0,074 ^h
3	Preta	0,704±0,007 ^g	0,098±0,016 ^{abcdef}	0,506±0,065 ^{ef}
4	Preta	0,718±0,015 ^{ef}	0,109±0,009 ^{bcd}	0,515±0,034 ^{ef}
5	Branca	1,634±0,044 ^h	0,041±0,003 ^{abcd}	0,362±0,027 ^{ef}
6	Branca	1,561±0,011 ^h	0,033±0,002 ^{ab}	0,269±0,051 ^{ab}
7	Branca	1,801±0,087 ⁱ	0,043±0,005 ^{abcde}	0,304±0,048 ^{abcd}
8	Branca	0,074±0,024 ^a	0,076±0,026 ^{abcdef}	0,278±0,029 ^{abc}
9	Branca	0,170±0,011 ^{abc}	0,042±0,008 ^{abcd}	0,354±0,036 ^{bcd}
10	Branca	0,185±0,028 ^{abc}	0,039±0,006 ^{abc}	0,276±0,034 ^{abc}
11	Branca	0,122±0,009 ^{ab}	0,041±0,017 ^{abcd}	0,396±0,012 ^{bcd}
12	Branca s/ álcool	0,082±0,063 ^a	0,045±0,010 ^{abcde}	0,485±0,078 ^{def}
13	Preta s/ álcool	0,419±0,046 ^f	0,125±0,022 ^{ef}	0,461±0,012 ^{cdef}
14	Limão s/ álcool	0,188±0,008 ^{abc}	0,042±0,025 ^{abcd}	0,267±0,030 ^{ab}
15	Limão	0,099±0,007 ^{ab}	0,020±0,005 ^a	0,304±0,022 ^{abcd}
16	Limão	0,163±0,010 ^{abc}	0,032±0,016 ^{ab}	0,240±0,022 ^{ab}
17	90	0,154±0,020 ^{abc}	0,060±0,012 ^{abcde}	0,500±0,172 ^{ef}
18	Bohemia trigo	0,199±0,024 ^{abc}	0,116±0,042 ^{cdef}	0,397±0,099 ^{bcd}
19	Bohemia puro malte	0,281±0,012 ^{cde}	0,067±0,005 ^{abcde}	0,607±0,067 ^{fg}
20	Bohemia original	0,357±0,050 ^{def}	0,123±0,003 ^{def}	0,500±0,048 ^{bcd}
21	Bohemia IPA	0,228±0,012 ^{bcd}	0,078±0,028 ^{abcdef}	0,487±0,051 ^{def}
22	Frutos vermelhos	0,451±0,026 ^f	0,089±0,020 ^{abcdef}	0,312±0,054 ^{abcd}
23	Panaché	0,191±0,012 ^{abc}	0,023±0,012 ^a	0,153±0,013 ^a
P-value		*** ^Y	***	***

^X Os valores são apresentados com média ± DP (n=3). Letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes (ANOVA, P>0,05), de acordo com o teste de Tukey.

^Y Significância: não significativo, N.S. (P>0,05); *significativo com P<0,05; ** significativo com P<0,01; *** significativo com P<0,001.

Relativamente aos fenóis totais, a amostra “cerveja 2 preta” (Tabela 4), tal como se observou nos *orto*-difenóis, revelou ter uma maior concentração em fenóis totais, com 0,824±0,074 g AG/L, sendo significativamente diferente de todas as outras cervejas em estudo; pelo contrário, a cerveja que apresentou menor concentração foi a “cerveja 23 panaché”, com 0,153±0,013 g AG/L distinguindo-se significativamente das outras cervejas.

Comparando com os valores de fenóis totais obtidos por Rampazzo (2014) verificam-se teores semelhantes com valores entre 0,549 e 1,088 g AG/L, com o mesmo método de determinação.

Zhao *et al.* (2010) obtiveram concentrações semelhantes às acima descritas, nomeadamente entre 0,152 e 0,340 g AG/L para 34 cervejas comerciais do tipo lager utilizando igualmente o método de Folin-Ciocalteu.

No estudo de Poejo (2009) os valores obtidos revelaram-se superiores estando compreendidos entre 0,293 e 1,159 g AG/L para cervejas brancas e pretas, respetivamente, tal como acontece no presente estudo onde as cervejas pretas revelaram maior concentração de fenóis totais e as brancas menores.

Como podemos observar, na Tabela 4, as cervejas pretas (1, 3, 4 e 13) apresentaram tendencialmente uma maior concentração em fenóis totais do que as cervejas brancas (4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 17); a “cerveja 1 abadia” é a segunda cerveja com maior teor em fenóis totais, com o valor de $0,706 \pm 0,027$ g AG/L, apresentando características intermédias entre as cervejas pretas e brancas.

Alguns autores como Freitas (2006) e Talufo *et al.* (2010), que também realizaram este método em amostras de cervejas brancas e pretas, verificaram um maior valor de fenóis totais em cervejas pretas $0,406 \pm 0,006$ g AG/L e $0,5632 \pm 0,004$ g AG/L, respetivamente.

Quanto à avaliação da atividade antiradicalar pelo método de ABTS, os resultados obtidos (Tabela 5) revelaram que a “amostra 4 preta” foi a cerveja que apresentou maior atividade ($0,107 \pm 0,002$ mmol trolox/L), não sendo significativamente diferente da amostra 2 “preta”; pelo contrário, as cervejas que apresentaram menor atividade antiradicalar foram as amostras de “cerveja 15 limão” e “cerveja 16 limão”, com igual valor de $0,008 \pm 0,0005$ mmol trolox/L, não sendo também significativamente diferentes das cervejas 11, 14 e 23 cerveja branca, com adição limão sem álcool e panaché, respetivamente.

Segundo Zhao *et al.* (2010) os valores obtidos para o ABTS estão no intervalo de 0,55 mmol trolox/L e 1,95 mmol trolox/L, claramente acima dos obtidos no presente estudo (0,008 e 0,107 mmol trolox/L). No estudo de Rampazzo (2014) os valores obtidos pelo método de ABTS foram semelhantes (0,004 e 0,073 mmol trolox/L) aos do presente trabalho (0,008 e 0,107 mmol trolox/L).

Tabela 6: Resultados da atividade antioxidante das amostras de cerveja.

Amostras		ABTS (mmol trolox/L)	DPPH (mmol trolox /L)
1	Abadia	0,049±0,001 ^d	0,021±0,001 ^a
2	Preta	0,102±0,007 ^e	0,019±0,002 ^a
3	Preta	0,016±0,001 ^b	0,020±0,001 ^a
4	Preta	0,107±0,003 ^e	0,021±0,001 ^a
5	Original	0,023±0,001 ^c	0,023±0,001 ^a
6	Branca	0,021±0,001 ^{bc}	0,023±0,001 ^a
7	Branca	0,023±0,001 ^c	0,022±0,001 ^a
8	Branca	0,019±0,000 ^{bc}	0,037±0,001 ^{de}
9	Branca	0,020±0,000 ^{bc}	0,032±0,002 ^{bc}
10	Branca	0,017±0,001 ^b	0,038±0,001 ^e
11	Branca	0,009±0,002 ^a	0,034±0,003 ^{cde}
12	Branca s/ álcool	0,020±0,002 ^{bc}	0,034±0,001 ^{cde}
13	Preta s/ álcool	0,018±0,001 ^{bc}	0,036±0,001 ^{cde}
14	Limão s/ álcool	0,009±0,001 ^a	0,032±0,003 ^{bc}
15	Limão	0,008±0,001 ^a	0,037±0,000 ^e
16	Limão	0,008±0,001 ^a	0,035±0,001 ^{cde}
17	90	0,016±0,002 ^b	0,033±0,002 ^{cd}
18	Bohemia trigo	0,021±0,001 ^{bc}	0,034±0,003 ^{cde}
19	Bohemia puro malte	0,018±0,001 ^{bc}	0,035±0,001 ^{cde}
20	Bohemia original	0,018±0,001 ^{bc}	0,034±0,000 ^{cde}
21	Bohemia IPA	0,018±0,001 ^{bc}	0,035±0,001 ^{cde}
22	Frutos vermelhos	0,020±0,001 ^{bc}	0,034±0,000 ^{cde}
23	Panaché	0,010±0,001 ^a	0,028±0,003 ^b
	P-value	***	***

^X Os valores são apresentados com média ± DP (n=3). Letras diferentes indicam resultados significativamente diferentes (ANOVA, P>0,05), de acordo com o teste de Tukey.

^Y Significância: não significativo, N.S. (P>0,05); *significativo com P<0,05; ** significativo com P<0,01; *** significativo com P<0,001.

Como era de esperar, as cervejas pretas apresentaram tendencialmente maior atividade antiradicalar, pelo método de ABTS, do que as cervejas brancas; a “cerveja 2 preta”, “cerveja 4 preta” e a “cerveja 1 abadia” são as cervejas com maior capacidade antioxidante pelo método de ABTS, com 0,102±0,007mmol trolox/L, 0,107±0,003mmol trolox/L e de 0,049±0,001mmol trolox/L, respetivamente, sendo que a primeira (cerveja 2 preta) não apresenta diferenças significativas com a “cerveja 4 preta” para um p<0,05, enquanto que a “cerveja 1 abadia” é significativamente diferente das outras amostras.

Para a metodologia do DPPH, os resultados obtidos (Tabela 5) revelaram a “cerveja 10 branca” como a cerveja com maior atividade antiradicalar, com 0,038±0,00 mmol trolox/L, não sendo significativamente diferente da “cerveja 15 limão”. Pelo contrário a “cerveja 2 preta”

apresentou menor atividade antiradicalar, com $0,019 \pm 0,002$ mmol trolox/L, não sendo significativamente diferente das cervejas 1, 3, 4, 5, 6 e 7 para $p < 0,05$.

Comparando os resultados do presente estudo com os de Zhao *et al.* (2010) verificamos que estes valores de DPPH são mais altos, variando entre 0,24 a 0,70 mmol trolox/L em cervejas do tipo lager. Pelo contrário, Rampazzo (2014) obteve valores menores (0,002 e 0,028 mmol trolox/L) correspondendo a cervejas tipo ale e lager.

As diferenças significativas encontradas em algumas amostras podem ser explicadas pelo fato destas serem de fabricantes distintos e apesar dos componentes base serem semelhantes, poderão existir diferenças ao nível das quantidades estabelecidas por cada fabricante e da origem de cada componente, mesmo sendo adotado o mesmo processo de produção.

3.2. Identificação dos compostos fenólicos existentes nas cervejas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Os espectros de absorção UV-vis de compostos fenólicos permitem a identificação de picos cromatográficos e a sua classificação. Uma combinação dos dados com os espectros UV e informações a partir da literatura pode ser usada para tentar identificar a estrutura dos compostos fenólicos (Yang *et al.*, 2011).

Para identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram usados: tempos de retenção, ordem de eluição, espectros UV-visível, dados da literatura e padrões de referência.

Foi feito um estudo quantitativo dos compostos para saber quais as cervejas com maior potencial e foram escolhidas três cervejas mais representativas (“cerveja 16 limão”, “cerveja 22 frutos vermelhos” e a “cerveja 3 preta”).

As figuras seguintes são os cromatogramas da “cerveja 16 limão” (Figura 14 e 15) a diferentes comprimentos de onda (280 e 330 nm) para identificar corretamente os compostos fenólicos presentes. No anexo 6 encontram-se os cromatogramas das outras duas cervejas analisadas.

Na “cerveja 16 limão” foram detetados a 280nm os seguintes compostos, representados nos picos pelos números de 1 a 4 (Figura 14):

- 1- Ácido gálico, com tempo de retenção de 3,44 min;
- 2- Galocatequina, com tempo de retenção de 5,47 min;
- 3- Epicatequina, com tempo de retenção de 9,40 min;

4- Ácido síringico, com tempo de retenção de 11,60 min.

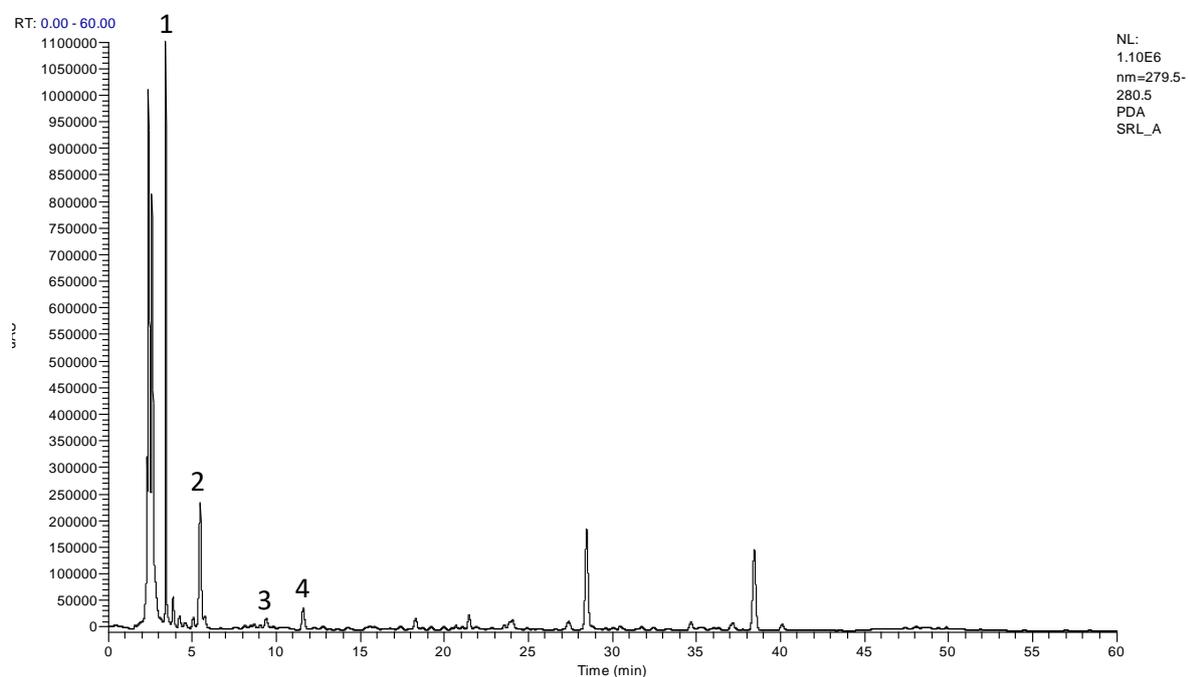


Figura 15: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 16 limão” (detecção a 280 nm).

Na “cerveja 16 limão” foram detetados a 330nm os seguintes compostos, representados nos picos pelos números de 1 a 6 (Figura 15):

- 1- Rutina (Quercitina-3-*O*-rutinosido), com tempo de retenção de 19,96 min;
- 2- Kaempferol-3-*O*-xilossilglucósido, com tempo de retenção de 21,47 min;
- 3- Kaempferol-3-*O*-glucósido, com tempo de retenção de 29,59 min;
- 4- Kaempferol-3-*O*-(6"-*O*-manolil)glucósido), com tempo de retenção de 31,72 min;
- 5- Kaempferol-3-*O*-(malonil)glucósido (tr: 32,41 min);
- 6- Quercitina (tr: 40,10 min).

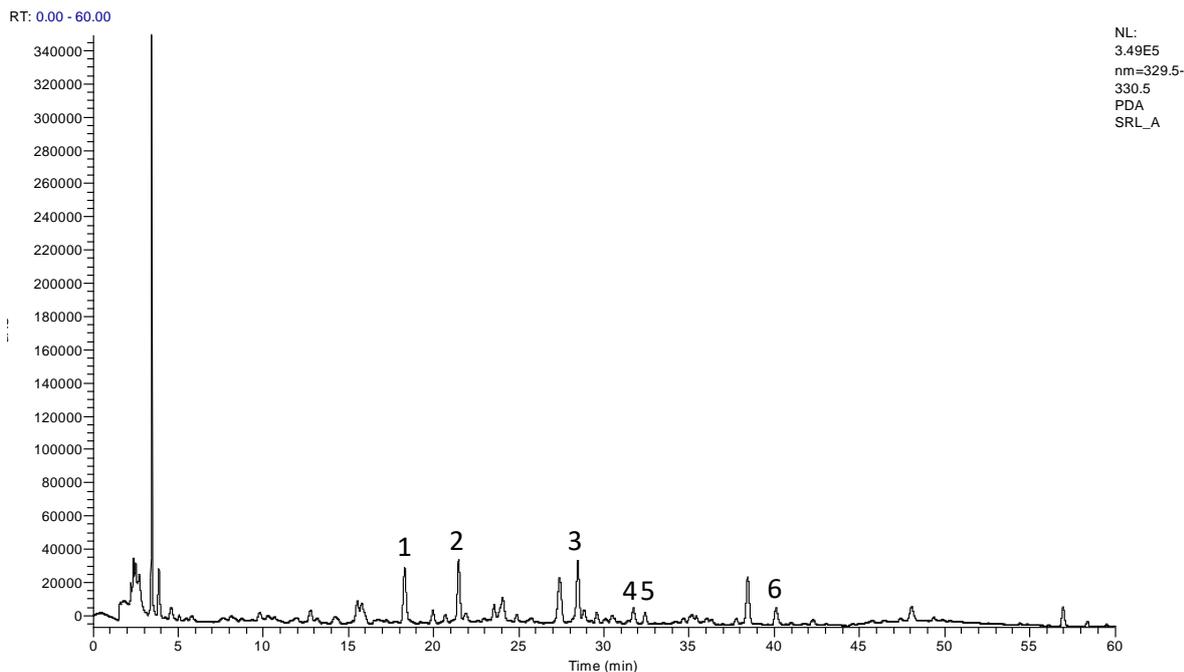


Figura 16: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 16 limão” (deteção a 330 nm).

As tabelas 6 e 7 apresentam os compostos fenólicos identificados e a respetiva quantificação nas amostras de cerveja, de acordo com os padrões utilizados.

Na tabela 6, podemos observar que o composto maioritário presente em todas as amostras de cerveja, pertencente à classe dos não flavonoides é o ácido gálico. Pelo contrário, o composto minoritário é o ácido hidroxibenzóico que se encontra na “cerveja 2 preta”, o ácido protocatecúico presente na “cerveja 5 branca” por fim também se detetou o ácido vanílico presente na “cerveja 18 bohemia trigo”.

Quanto à classe dos flavonoides (Tabela 7) a galocatequina é o composto maioritário, pois está presente em todas as amostras, exceto na “cerveja 2 preta”.

O kaempferol está presente em quatro das vinte e três cervejas analisadas.

O composto menos abundante, encontrado em apenas uma das amostras, nomeadamente na “cerveja 22 frutos vermelhos” é o ácido caféico.

Tabela 7: Quantificação dos compostos fenólicos em cada cerveja (classe dos não flavonoides).

Amostras	Compostos	Ácido gálico	Ácido protocatecúico	Ácido hidroxibenzóico	Ácido vanílico	Ácido ferúlico	Ácido caféico	Ácido siríngico
	fenólicos (ug/mL)							
1 Abadia		95,80±3,706	-	-	-	-	-	10,36±1,150
2 Preta		24,37±0,414	28,43±0,259	12,33±0,248	-	1,487±0,060	-	-
3 Preta		70,43±6,509	-	-	-	-	-	6,689±0,126
4 Preta		68,62±2,894	-	-	-	-	-	8,378±0,182
5 Branca		-	3,514±0,559	-	-	-	-	5,559±0,577
6 Branca		52,64±3,088	-	-	-	-	-	11,67±0,058
7 Branca		48,12±7,127	-	-	-	-	-	9,253±0,628
8 Branca		45,03±1,265	-	-	-	-	-	7,242±0,152
9 Branca		67,77±3,886	-	-	-	-	-	11,33±0,936
10 Branca		46,46±3,095	-	-	-	-	-	6,806±0,737
11 Branca		45,07±0,053	-	-	-	-	-	5,888±0,598
12 Branca s/ álcool		79,76±11,19	-	-	-	-	-	12,40±1,617
13 Preta s/ álcool		76,93±7,420	-	-	-	-	-	-
14 Limão s/ álcool		25,08±0,348	-	-	-	-	-	-
15 Limão		35,76±3,465	-	-	-	0,310±0,004	-	4,046±0,426
16 Limão		25,01±0,015	-	-	-	-	-	2,868±0,009
17 90		72,67±5,502	-	-	-	-	-	3,256±0,096
18 Bohemia trigo		64,62±1,911	-	-	1,332±0,086	-	-	3,471±0,284
19 Bohemia puro malte		80,27±12,68	-	-	-	-	-	3,718±0,387
20 Bohemia original		60,87±5,143	-	-	-	-	-	7,542±0,500
21 Bohemia IPA		71,70±1,325	-	-	-	-	-	2,561±0,133
22 Frutos vermelhos		46,65±3,963	-	-	-	-	29,24±3,638	3,204±0,423
23 Panaché		29,21±4,113	-	-	-	-	-	2,284±0,308

Tabela 8: Quantificação dos compostos fenólicos em cada cerveja (classe dos flavonoides).

Compostos fenólicos (ug/mL)	Kaempferol	Catequina	Kaempferol-3-O-(malonil)glucósido	Epicatequina	Kaempferol-3-O-(6"-O-manolil)glucósido	Quercitina	Rutina (Quercitina-3-O-rutinósido)	Kaempferol-3-O-xilosilglucósido	Kaempferol-3-O-glucósido	Delfinidina-3-O-glucósido	Galocatequina
Amostras											
1 Abadia	0,200±0,025	-	-	215,1±22,58	-	-	-	-	-	-	63,59±7,84
2 Preta	0,213±0,005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 Preta	0,232±0,024	-	-	93,32±8,559	-	-	-	-	-	-	95,23±10,25
4 Preta	0,168±0,020	40,82±5,257	-	-	-	-	-	-	-	-	66,50±2,395
5 Branca	-	86,47±5,308	-	-	-	-	-	-	-	-	21,44±2,873
6 Branca	-	18,91±0,398	-	-	-	-	-	-	-	-	58,57±0,002
7 Branca	0,086±0,004	31,49±0,271	-	28,45±3,154	-	-	-	-	-	-	29,94±2,191
8 Branca	-	96,13±17,00	-	43,48±1,838	-	-	-	-	-	-	27,19±1,469
9 Branca	-	78,97±1,301	-	87,71±3,843	-	-	-	-	-	-	86,70±1,893
10 Branca	0,054±0,001	2,273±0,104	-	45,47±6,296	-	-	-	-	-	-	23,88±1,029
11 Branca	-	1,413±0,008	-	64,89±0,119	-	-	-	-	-	-	37,76±0,399
12 Branca s/ álcool	-	2,295±0,211	-	144,2±20,56	-	-	-	-	-	-	89,63±2,005
13 Preta s/ álcool	-	3,374±0,398	-	86,26±2,472	-	-	-	-	-	-	76,18±0,231
14 Limão s/ álcool	-	-	0,309±0,019	40,11±3,524	0,335±0,006	0,655±0,032	1,998±0,196	1,672±0,117	0,212±0,002	-	144,0±10,93
15 Limão	-	-	-	3,277±0,184	-	-	-	-	-	-	83,50±2,000
16 Limão	-	3,870±0,004	0,391±0,005	7,944±0,483	0,439±0,005	0,733±0,033	0,462±0,023	1,725±0,078	0,270±0,027	-	73,89±0,578
17 90	0,133±0,019	-	1,070±0,113	197,5±18,23	-	-	-	-	-	-	74,00±1,365
18 Bohemia trigo	-	44,10±5,416	-	221,5±10,91	-	-	-	-	-	-	53,95±1,259
19 Bohemia puro malte	0,152±0,010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,875±0,764
20 Bohemia original	0,143±0,017	-	-	35,61±2,880	-	-	-	-	-	-	47,87±4,052
21 Bohemia IPA	-	-	-	158,5±3,155	-	-	-	-	-	-	48,74±2,257
22 Frutos vermelhos	0,057±0,008	155,3±2,091	0,243±0,011	11,34±1,118	0,435±0,068	0,266±0,039	-	-	-	a	137,8±7,121
23 Panaché	0,063±0,04	-	-	21,08±1,819	-	-	-	-	-	-	72,576±7,397

^a: Foi identificada uma antocianidina, nomeadamente uma delfinidina.

Foram também identificadas outras antocianidinas, mas devido à inexistência de padrões não foi possível fazer a sua identificação e quantificação.

A partir dos resultados obtidos por meio da análise de compostos isolados, pode-se observar que compostos como ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, ácido siríngico e kaempferol foram identificados em quase todas as amostras de cerveja.

Outros autores como Zhao *et al.* (2010) também identificaram alguns destes compostos em amostras de cerveja. Para o ácido gálico verificou-se que os teores obtidos no presente trabalho são dez vezes superiores aos do autor referido anteriormente ($10,39 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ e $1,81 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) tendo sido a cerveja “1 abadia” com maior teor ($95,80 \pm 3,706 \mu\text{g/ml}$) e a cerveja “2 preta” com menor teor ($24,37 \pm 0,414 \mu\text{g/mL}$).

Um facto interessante e de grande importância, é que o ácido gálico, dentro da classe dos compostos fenólicos, é um composto largamente estudado pelas suas propriedades benéficas e que se apresenta nas fontes naturais mais importantes de compostos fenólicos.

A cerveja com maior teor de ácido protocatecúico foi a cerveja “2 preta” com $28,43 \pm 0,259 \mu\text{g/mL}$ e com menor concentração foi a cerveja “5 branca” $3,51 \pm 0,559 \mu\text{g/mL}$, sendo valores superiores aos obtidos pelo autor Zhao *et al.* (2010) tendo a cerveja com menor teor $0,02 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e com maior teor $1,30 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

O ácido hidroxibenzóico só se revelou numa das amostras de cerveja “2 preta” com concentração de $12,33 \pm 0,248 \mu\text{g/mL}$, pelo que o autor anteriormente referido não encontrou esse composto fenólico, o mesmo aconteceu para o ácido vanílico com uma concentração de $1,332 \pm 0,086 \mu\text{g/mL}$ na cerveja “18 bohemian trigo”.

A concentração da catequina obtida no presente trabalho verificou-se ser superior em relação aos autores Zhao *et al.* (2010), nomeadamente $155,3 \pm 2,091 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja “19 bohemian puro malte” e $1,413 \pm 0,008 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja “8 branca” e os valores do autor foram entre $0,13 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e $4,00 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$.

Para a epicatequina a cerveja “18 bohemian trigo” foi a que teve maior concentração $221,5 \pm 10,91 \mu\text{g/mL}$ e a amostra que teve menor concentração foi “22 frutos vermelhos” com $11,34 \pm 1,118 \mu\text{g/mL}$, enquanto que os autores Zhao *et al.* (2010) obtiveram valores muito baixos para o mesmo composto fenólico tendo a cerveja com maior concentração $0,73 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ e com menor concentração $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

A concentração de ácido siríngico verificou-se superior na cerveja “12 branca s/álcool” $12,40 \pm 1,617 \mu\text{g/mL}$ e menor na cerveja “23 panaché” $2,284 \pm 0,308 \mu\text{g/mL}$, os valores registados pelos autores referidos anteriormente são inferiores, tendo a cerveja com menor concentração $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ e a cerveja com maior concentração $0,99 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$.

A concentração em ácido ferúlico foi superior na cerveja “2 preta” e inferior na cerveja “15 limão” com concentração de $1,487 \pm 0,060 \mu\text{g/mL}$ e $0,310 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Zhao *et al.* (2010) obtiveram os seguintes valores $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $2,81 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ nas suas amostras de cerveja, sendo estes superiores aos obtidos no presente estudo.

Walters *et al.* (1997) demonstraram que o ácido ferúlico tem maior atividade antioxidante que a catequina na presença do radical hidroxilo, além de ser mais efetivo na prevenção da oxidação lipídica.

Os compostos fenólicos presentes na cerveja provêm do lúpulo e, na grande maioria, do malte da cevada, fazendo com que a bebida se torne uma fonte de polifenóis.

Contudo, os compostos derivados do lúpulo são mais fáceis de caracterizar que os provenientes da cevada, pois durante o processamento da bebida estes podem sofrer mudanças, tornando-os de difícil caracterização (Siqueira; Bolini; Macedo, 2008)

Assim, em grãos de cevada têm sido identificados derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, como o ácido *trans*-ferúlico, encontrado em maior quantidade no grão, seguido dos ácidos *p*-cumarínico e vanílico. Estes ácidos são conhecidos por atuarem como antioxidantes primários na reação de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia encontrando-se presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão (Bezerra, 2013).

Por fim, o ácido caféico foi apenas quantificado numa das amostras de cerveja “22 frutos vermelhos” com a concentração de $29,24 \pm 3,638 \mu\text{g/mL}$, já Zhao *et al.* (2010) quantificaram este composto em várias amostras de cerveja, com concentrações entre $0,12 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $1,22 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

No presente estudo foram encontrados os mesmos compostos fenólicos que os autores Siqueira *et al.* (2008) referiram no seu trabalho, com a exceção da procianidina.

Um dos flavonoides presentes nas amostras de cerveja neste trabalho, foi a rutina. Segundo Maciel *et al.* (2013), este flavonóide produz efeitos benéficos associados ao aumento da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, diminuindo os fatores de risco para aterosclerose e doenças cardiovasculares, além da elevação do colesterol-HDL.

Em pesquisa recente, compostos fenólicos como a rutina, ácido caféico, ácido ferúlico e miricetina, foram identificados e quantificados em diferentes cultivares de cevada brasileira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Esses compostos têm exercido efeito cardioprotetor, hipolipídico, hipotensivo, antiviral e anti-inflamatório (Bezerra, 2013). Geralmente os compostos fenólicos são encontrados na cerveja ligados a outros compostos,

como ésteres e glicosídeos, mas também é possível encontrá-los na sua forma livre, e algumas substâncias apresentarão maior possibilidade de serem encontradas no malte ou no lúpulo.

Os derivados de ácidos hidrobencóicos e ácidos hidroxinâmicos, como, por exemplo, os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e caféico (identificados pelos testes), são extraídos mais comumente do malte, enquanto do lúpulo provêm essencialmente os flavonóis, calconas e flavanonas. Igualmente detetáveis, tanto no lúpulo quanto no malte, são os taninos derivados de flavonóis, catequinas e procianidinas (Maciel *et al.* 2013).

Os compostos fenólicos presentes na cerveja provêm do lúpulo (30%) e, na sua grande maioria, do malte da cevada (70%), fazendo com que a bebida se torne uma fonte de compostos fenólicos.

Porém, os compostos derivados do lúpulo são mais fáceis de serem caracterizados do que os da cevada, pois durante o processamento da bebida estes podem sofrer alterações, tornando-os de difícil caracterização. Dentro das diversas etapas que constituem o processo de produção da cerveja, a filtração surge como uma das maiores responsáveis pela redução drástica do teor de polifenóis presentes na matriz final (Magalhães, 2006).

A presença de compostos fenólicos na cerveja pode proporcionar assim uma ação antioxidante, tornando-a capaz de auxiliar em alguns distúrbios fisiológicos do organismo, sem a preocupação dos efeitos do álcool devido ao seu baixo teor na bebida (Maciel *et al.* 2013).

3.3. Análises estatísticas

3.3.1. Análise de componentes principais (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) representa uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas. A ACP é uma técnica não supervisionada, que reduz a dimensionalidade da matriz original de dados mantendo o máximo de variabilidade e permite a visualização do arranjo original das amostras num espaço n-dimensional, através da informação mantida, permitindo que a relação entre as variáveis e observações a serem estudadas, bem como o reconhecimento da estrutura de dados.

A explicação das diferenças nas amostras, por meio dos fatores obtidos a partir da matriz de correlação generalizada dos conjuntos de dados e ao mesmo tempo para determinar quais as variáveis que mais contribuem para a diferenciação de tais (Figura 16).

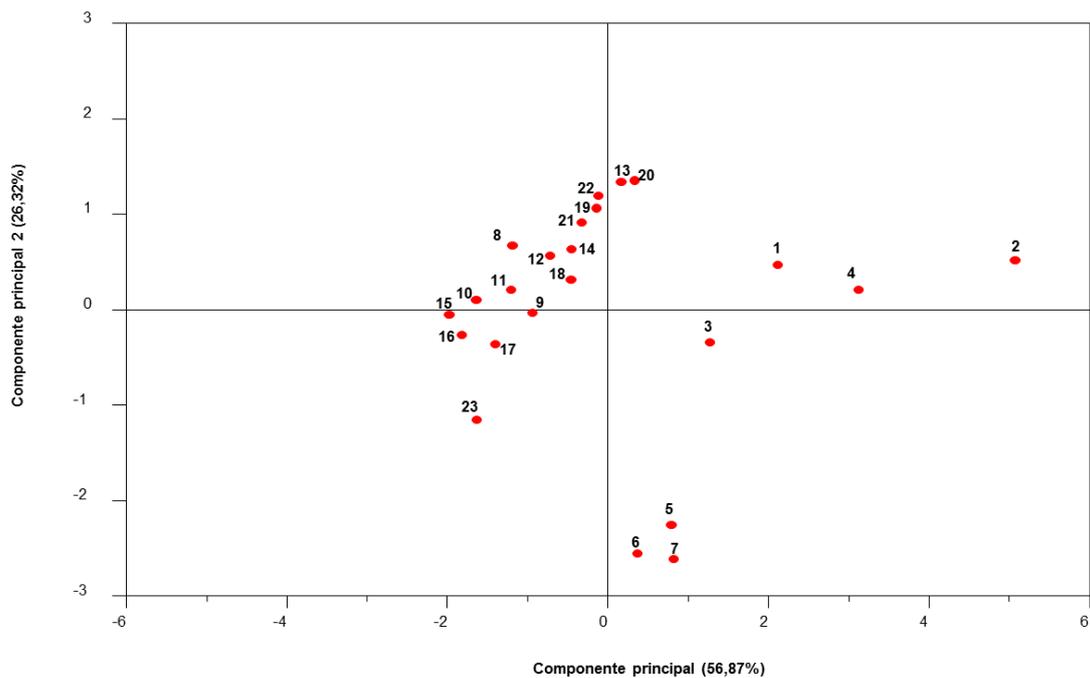


Figura 17: Gráfico de dispersão simples (componente principal 1 x componente principal 2) sobre as principais fontes de variabilidade das cervejas.

A ACP foi aplicada para avaliar os dados dos principais compostos fenólicos determinados, nomeadamente *orto*-difenois, fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (ABTS e DPPH) (Figura 21). O primeiro componente principal foi capaz de explicar 56,87% da variância total e o segundo explicou 26,32%, totalizando 83,19% (Anexo 7).

O gráfico de dispersão simples (Figura 18) sugere a localização das cervejas em relação à composição fenólica e à atividade antioxidante e foi possível observar a formação de cinco grupos. O grupo representado pela cor azul escuro foi o que apresentou os maiores valores de DPPH, o grupo representado a verde foi o que apresentou maiores valores em *orto*-difenois, o grupo representado por vermelho apresentou valores superiores para os flavonoides e fenóis totais, por último, o grupo representado pela cor preta, foi o que apresentou maiores valores para a atividade antioxidante, nomeadamente ABTS.

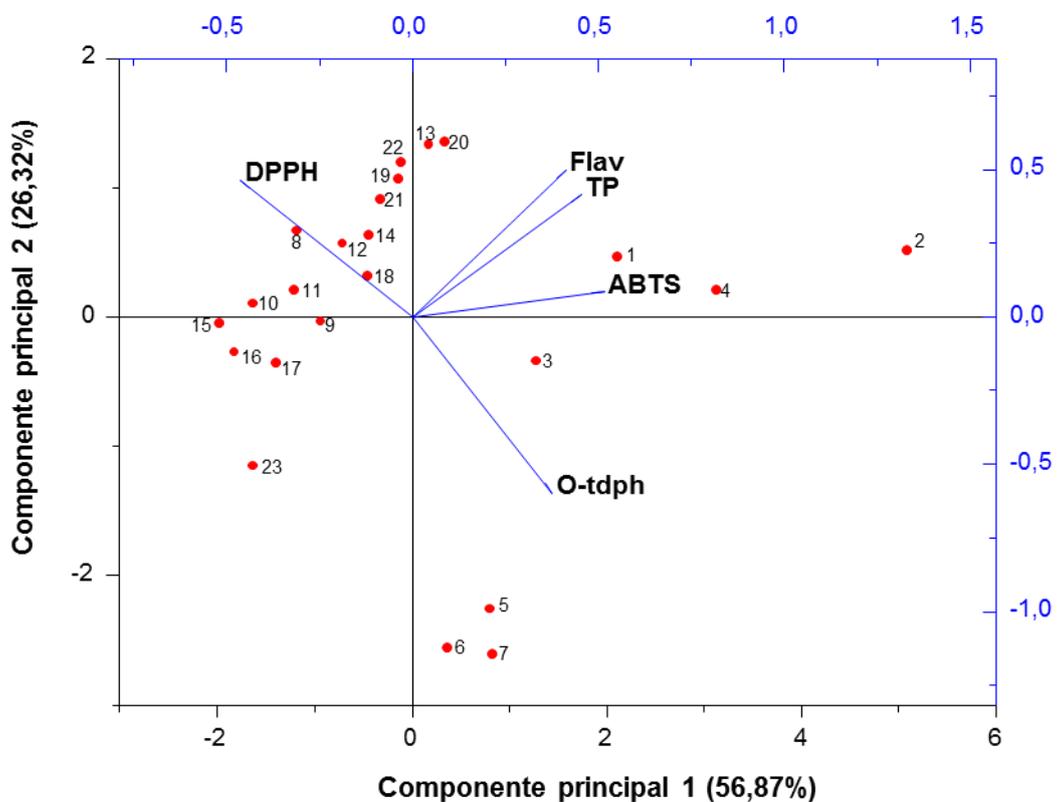


Figura 18: Projeção dos valores obtidos para os CP's 1 e 2 para as diferentes amostras. Os pesos de cada variável, para cada um dos fatores, encontram-se representados através do posicionamento das abreviaturas nos quadrantes.

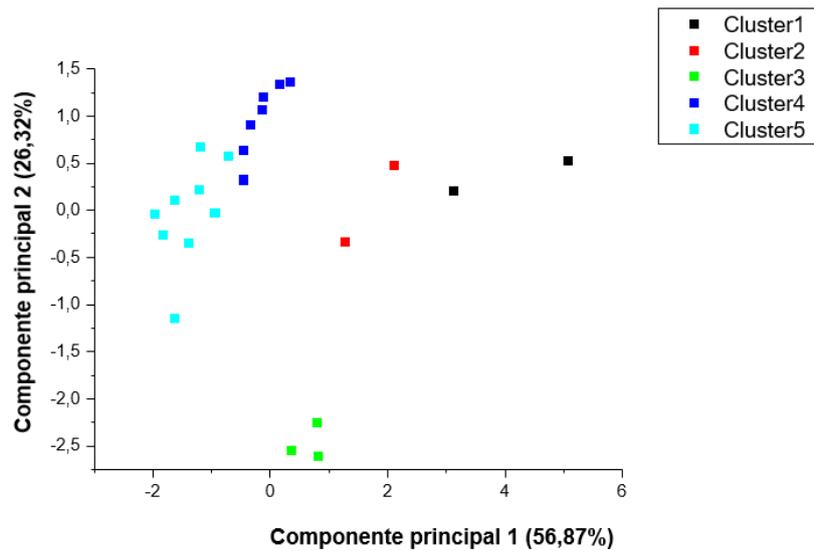


Figura 19: Agrupamento resultante da análise de *clusters*, diferentes cores referem-se a grupos distintos. A distribuição das amostras encontra-se representada segundo os valores para os CP's 1 e 2.

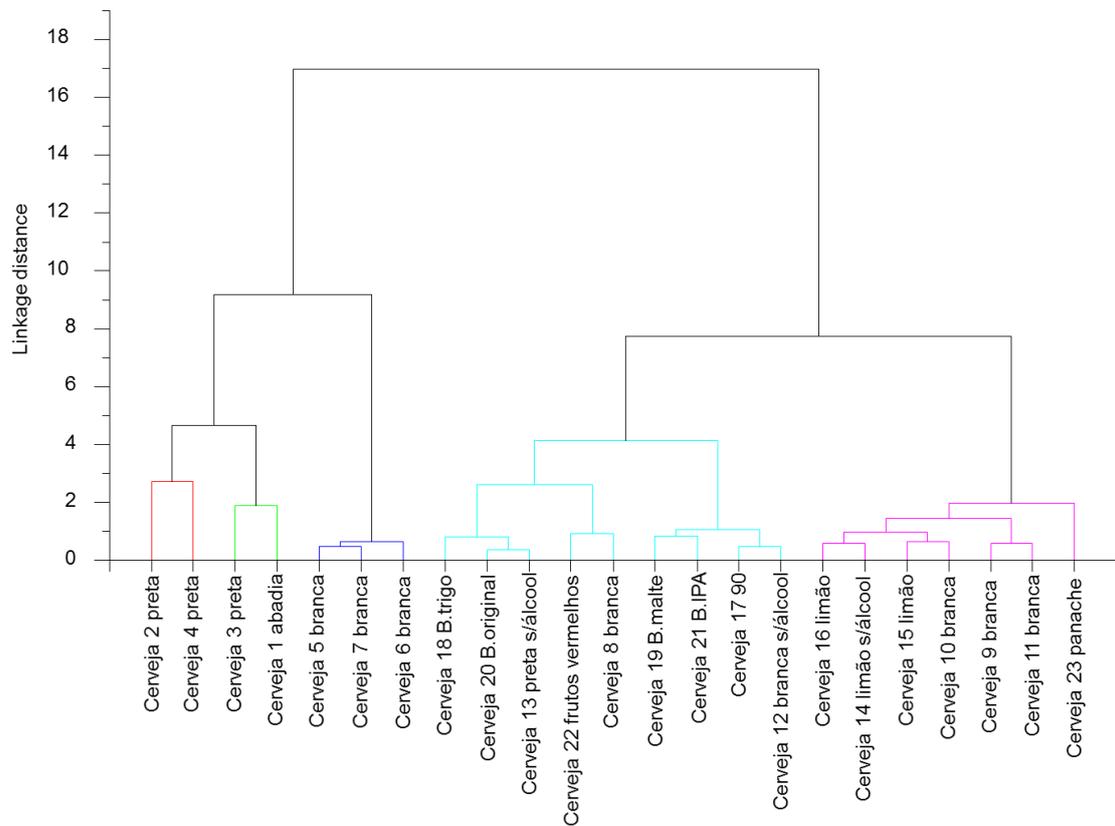


Figura 20: Dendrograma para as cervejas obtido pela análise hierárquica de agrupamentos

A similaridade das amostras foi avaliada usando análise hierárquica de agrupamentos e cinco grupos foram sugeridos (Figura 17), no qual corroboram com os resultados encontrados pela ACP. As médias para cada variável resposta foi comparada estatisticamente. Por meio da separação dos grupos, é possível observar que no cluster 1 encontram-se a “cerveja 2 preta” e “cerveja 4 preta”, estas assemelham-se pela atividade anti radicalar pelo ABTS.

No cluster 2, estão contidas as amostras “cerveja 1 abadia” e “cerveja 3 preta” pois estão no quadrante da atividade antiradicalar pelo ABTS e teor em *orto*-difenóis.

No cluster 3, encontram-se as cervejas “cerveja 5 branca”, “cerveja 6 branca” e “cerveja 7 branca”, uma vez que estas têm teor idêntico em *orto*-difenóis, daí agruparem-se no mesmo quadrante.

No cluster 4 estão as amostras “cerveja 8 branca”, “cerveja 12 branca s/ álcool”, “cerveja 13 preta s/ álcool”, “cerveja 17 90”, “cerveja 18 bohemia trigo”, “cerveja 19 bohemia puro malte”, “cerveja 20 bohemia original”, “cerveja 21 bohemia IPA”, “cerveja 22 frutos vermelhos” pois estas tem em comum o teor em flavonoides, fenóis totais e valores de atividade antiradicalar para o DPPH.

Por fim, no *cluster* 5 encontram-se a “cerveja 9 branca”, “cerveja 10 branca”, “cerveja 11 branca”, “cerveja 14 limão s/ álcool”, “cerveja 15 limão”, “cerveja 16 limão” e “cerveja 23 panaché” estas cervejas tem características comuns no teor em *orto*-difenóis e mesma atividade antiradicalar para o DPPH (Figura 19).

Tabela 9: Peso de cada variável para os componentes principais

	PC1	PC2
<i>Orto</i>-difenóis	0,3765	-0,59563
Fenóis totais	0,45471	0,41383
Flavonoides	0,41221	0,49995
ABTS	0,51781	0,08682
DPPH	-0,462	0,4658

Por meio da análise estatística de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$) foi possível observar através dos resultados obtidos que as análises realizadas obtiveram correlação significativa entre si (Tabela 8). Estas correlações são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 10: Teste do coeficiente de correlação de Pearson (r).

	Orto-difenóis	Fenóis totais	Flavonóides	ABTS	DPPH
Orto-difenóis	1	0,15627	0,10443	0,4078***	-0,75267***
Fenóis totais	0,15627	1	0,61357***	0,60149***	-0,33056**
Flavonóides	0,10443	0,61357***	1	0,50369***	-0,17144
ABTS	0,4078***	0,60149***	0,50369***	1	-0,58414***
DPPH	-0,75267***	-0,33056**	-0,17144	-0,58414***	1

*referenciam a correlação entre as amostras (P≤0,05).
 *valor < 0,05
 **valor < 0,01
 *** valor <0,001

Existe correlação significativa dos *orto*-difenóis para a atividade antiradicalar do ABTS e DPPH, no caso deste último ser negativamente correlacionado.

No caso dos fenóis totais a correlação é significativa para os flavonoides, atividade antiradicalar para o ABTS e DPPH sendo este último negativamente correlacionado.

Para os flavonoides, a correlação é significativa para os fenóis totais e para a atividade antiradicalar pelo ABTS.

Para a atividade antiradicalar pelo ABTS, este correlaciona-se com os *orto*-difenóis, fenóis totais e flavonoides, correlacionando-se negativamente mais uma vez pela atividade antiradicalar pelo DPPH.

Por fim, a atividade antiradicalar do DPPH, correlaciona-se negativamente com os *orto*-difenóis, fenóis totais e atividade antiradicalar pelo ABTS. Isto deve-se a serem inversamente proporcionais, quando o valor de uma variável tende a subir o outro desce.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES

4. Conclusões

A cerveja, como produto final fermentado, é uma matriz química complexa que resulta de numerosas reações metabólicas e químicas, decorrentes da interação das leveduras com compostos presentes no mosto.

Assim, esta dissertação teve como objetivos determinar e quantificar o teor de *orto*-difenóis, fenóis totais e flavonoides, avaliar a atividade antioxidante através dos métodos de DPPH e ABTS, efetuar a caracterização do perfil fenólico das cervejas por HPLC-DAD e, por fim, correlacionar os parâmetros fenólicos estudados com a atividade antioxidante e com os diferentes tipos de cerveja estudados.

Assim, as amostras de cervejas estudadas apresentaram bons resultados no conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, demonstrando que quando consumida moderadamente, pode ser uma fonte de compostos bioativos, podendo trazer os benefícios que esta classe proporciona.

A “cerveja 7 branca” revelou-se a cerveja com a maior concentração de *orto*-difenóis $1,801 \pm 0,087$ g AG/L.

A “cerveja 2 preta” revelou uma concentração de flavonoides e fenóis totais de $0,151 \pm 0,017$ g CAT/L e $0,824 \pm 0,074$ g AG/L, respetivamente. Pelo que os estudos de Freitas (2006), Poejo (2009) e Talufo et al. (2010), revelaram um maior teor destes compostos.

Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram que as amostras de cerveja com limão e as com frutos vermelhos contêm uma maior quantidade de compostos fenólicos, o que pode ser explicado pela adição de extratos cítricos e de frutas vermelhas que são uma fonte de vitamina C, funcionado como antioxidantes e anti-cancerígenas.

Desta forma, podemos considerar que estas serão mais benéficas para a saúde do Homem, pela elucidação dos seus efeitos biológicos são uma base fundamental de suporte para o conceito de alimentação funcional.

Os resultados referentes à atividade antioxidante foram elevados tanto na determinação pelo método ABTS como DPPH, embora o método DPPH tenha apresentado os maiores valores, o que era de esperar, pois a cerveja é uma bebida rica em compostos fenólicos que a fazem adquirir capacidade antioxidante.

Observou-se ainda uma correlação positiva entre a média do conteúdo de polifenóis totais com a média dos valores de TEAC, o que indica uma forte influência dos compostos fenólicos sobre a atividade antioxidantes das cervejas.

Neste trabalho verificou-se que as cervejas foram agrupadas em 5 *clusters* de acordo com as suas características, composição fenólica e atividade antiradicalar, para a ACP.

Geralmente os compostos fenólicos são encontrados na cerveja ligados a outros compostos, como ésteres e glicosídeos, mas também é possível encontrá-los na forma livre, e algumas substâncias apresentarão maior possibilidade de serem encontradas ou no malte ou no lúpulo.

A presença de compostos fenólicos na cerveja proporciona uma ação antioxidante, tornando-a capaz de auxiliar em alguns distúrbios fisiológicos do organismo, sem a preocupação dos efeitos do álcool devido a seu baixo teor na bebida.

Relativamente à quantificação dos compostos fenólicos, o composto presente maioritariamente foi o ácido gálico (não flavonoides), estando presente em todas as cervejas, com exceção da “cerveja 5 branca”. Pelo contrário, o composto pertencente aos flavonoides que está presente em todas as amostras é a galocatequina, com a exceção da “cerveja 2 preta”.

As vinte e três cervejas analisadas apresentaram na sua composição a presença de compostos que são essenciais na dieta humana, não se diferenciando muito em relação ao perfil de composição. Sendo assim, ao consumi-las, indiferentemente da marca e variedade de cervejas, estarão usufruindo dos benefícios oferecidos por esses mesmos compostos, desde que o consumo da bebida seja de forma moderada e consciente.

As análises estatísticas demonstraram correlações significativas entre os testes químicos e entre alguns dos compostos identificados por HPLC.

Por fim, este estudo indica que a cerveja, desde que consumida de forma moderada pode ser considerada uma importante fonte de compostos fenólicos com capacidade de atuar como antioxidantes.

CAPÍTULO V - BIBLIOGRAFIA

5. Bibliografia

- Ambev. Programa de formação técnica cervejeiros. Jacareí, 2011.
- Aquarone, E.; Borzani W.; Schmidell W.; Lima; A. U. *Biotecnologia Industrial*. 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher, p.91-143, 2001.
- Araújo, F.B.; Silva, P.H.A.; Minim, V.P.R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 23, p. 121-128, 2003.
- Bamforth, C. W. *Beer Health and Nutrition*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.
- Bamforth, Charles. *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*. 2nd ed. Oxford University Press, 2003.
- Bezerra, A. S., Nornberg, J. L. L., Fernanda O., Rosa M. B., Carvalho L. M. Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.43, n.9, p.1546-1552, 2013.
- Boulton, C., e Quain, D. *Brewing Yeast and Fermentation*. John Wiley & Sons, 2008.
- Carvalho, G.B.M., Bento, C.V., Almeida e Silva, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª. Parte-As leveduras. *Revista Analítica*, v.25, p.36 - 42, 2006.
- Cortacero-Ramirez, S. et al. Analysis of beer components by capillary electrophoresis methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 7, p. 440-445, 2003.
- De Keukelerie, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, n. 23, p. 108-112, 2000.
- Dragone, G.; Mussati, S.I.; Silva, J.B.A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n.27, p. 37-40, 2007.
- Eblinger, H., e Narzib, L. "Beer." In *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry* - Weinheim: Wiley-VCH, 177-221, 2012.
- Eblinger, H. M., *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. John Wiley & Sons, Alemanha, 2009.
- Freitas, Gisele Laisa; Kuskoski, Eugênia Marta; Gonzaga, Luciano; Fett, Roseane. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. *Alimentos e Nutrição*, v.17, no 3, p. 303-307, 2006.

Gonzalez San Jose, M. L.; Muniz Rodriguez, P.; Vall Belles, Y. V. Actividad antioxidante de la cerveza:estúdios in vitro e in vivo (1º parte). *Cerveza e Salud*. v. 154, p. 47-54, 2001.

Gouvinhas, I. Almeida, J.M.M.M., Carvalho, T., Machado, N, Barros, A.I.R.N.A. “Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics” *Food Chemistry*, n.174, 226–232, 2015.

Gupta, M., Abu-Ghannam, N. e Gallagher, E. “Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of Its By-Products.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (3). Blackwell Publishing Inc: 318–28, 2010.

Heim, K. E.; Taliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.572-584, 2002.

Lange, T.; FORTY, J. *Cervejas*. Tradução Dinah de Abreu Azevedo. São Paulo: Nobel, 1999.

Linko, L., Haikara, A., Ritala, A., Pentillä, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65: 85-98, 1998.

Maciel, Denis Cardoso; Elói, Lígia Mara Henrique. Compostos fenólicos em diferentes marcas de cerveja: comparação qualitativa de diferentes marcas e sua relação com a saúde humana. *Revista Uniara*. v.16, no1, p. 41-52, 2013.

Magalhães, Paulo J. Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de xantohumol e isoxanto-humol no lúpulo e na cerveja. Dissertação para Mestrado. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 2006.

Martinez, C.E., Garcia, F.M.S.,Torrado, A.A., Pastrana, C.L.M., Simal, G. Liquid chromatography for the determination of polyphenols in beers. *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, San Diego, USA, p.281–292, 2009.

Moll, M. “Water in Malting and Brewing.” *Brewing Science* 1: 539–77, 1979.

Morado, R. *Larousse da cerveja*. São Paulo: Larousse, 2009.

Nakamura, Tieme; Coichev, Nina; Moya, Horacio Dorigan. Modified Cuprac spectrophotometric quantification of total polyphenol content in beer samples using Cu (II)/neocuproine complexes. *Journal of Food Composition and Analysis*. v.28, p. 126-134, 2012.

Noel, S.; Liégeois, C.; Lermusieau, G.; Bodrat, E.; Badot, C.; Collin, S. Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized in the boiling kettle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 4323-4326, 1999.

Oliver, G. "The Oxford Companion to Beer." p. 960, 2011.

Palmer, J., e Kaminski, C. "Water: A Comprehensive Guide for Brewers". 1st ed. Colorado: Brewers publications, 2013.

Papazian, C. "Beer Styles: Their Origins and Classification." In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 39–77, 2006.

Poejo, P. L. P. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes tipos de bebidas: vinho e cerveja. Universidade nova de lisboa. Faculdade de ciências e tecnologias. Lisboa, 2009.

Portaria 1/96 de 3 de Janeiro. Diário da República nº 2/96 – I Série – B. Ministério da economia e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas, Lisboa.

Quain, D.E. "Differentiation of Brewing Yeast." *Journal of the Institute of Brewing* 92: 435–38, 1986.

Rampazzo, V. Caracterização da composição fenólica e capacidade antioxidante de cervejas comerciais de diferentes processos de fermentação, universidade tecnológica federal do Paraná, coordenação de tecnologia e engenharia de alimentos. Campo Mourão, 2014.

Rodrigues, S. Passagem da análise de contagem de células de levedura para autocontrole pelo método de sysmex. Dissertação de mestrado em engenharia química. Universidade de Coimbra. Junho, 2011.

Russell, I. "Yeast." In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 281–333, 2006.

Sierksma, A. Kok, F, J. Beer and Health: From Myths to Science. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66, 869 – 870, 2012.

Silva, P.H.A.; Faria, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 28, p. 902-906, 2008.

Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J., Larondelle, Y. "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region". *Food Chemistry*, n.101, 1012-1018, 2007.

Silva, J. B. A. Cerveja. In: Filho, W. G. V. *Tecnologia de Bebidas: matéria-prima; processamento; BPF; APPCC; legislação e mercado*. São Paulo: Blucher, 2005.

Siqueira, Priscila Becker; Bolini, Helena Maria André; Macedo, Gabriela Alves. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. *Alimentos e Nutrição*. v.19, p.491-498, 2008.

Sousa, C., Gouvinhas, I., Barreira, D., Carvalho, M.T., Vilela, A., Lopes, J., Lopes, P.M., Barros, A.I.” ‘Cobrancosa’ Olive Oil and Drupe: Chemical Composition at Two Ripening Stages” *Journal of the American Oil Chemistry Society*, n.91,599–611, 2014.

Strong, G. e England, K. 2015. “Beer Judge Certification Program. Style Guidelines.” *Beer Judge Certification Program*, 93, 2015.

Talupo, Paula Alexandra Ribeiro; Queirós, Raquel Barbosa; Matos, Cristina Maria Delerue; Sales, Maria Goreti Ferreira. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*. v. 43, p.1702-1709, 2010.

Taylor, D. “Water.” In *Handbook of Brewing*, edited by Fergus G. Priest and Graham Stewart, 2nd ed., 93–135, 2006.

Ullrich, S.E. *Barley: Production, Improvement, and Uses*. Wiley-Blackwell, 2011.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84, 2007.

Vidgren, V. *Maltose and Maltotriose Transport into Ale and Lager Brewer’s Yeast Strains*. VTT Publications, 2010.

Walters, M. T.; Heasman, A. P.; Hugues, P. S. Comparison of (+)-catequin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavour stability. Part I: forced-aging. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v. 55 n. 2, p. 43-89, 1997.

Willaert, R. “Biochemistry of Beer Fermentation.” *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*, no. Meussdoerffer: 627–53, 2012.

Yang, Haihua., Ge, Yiqiang., Sun, Yujing., Liu, Donghong., Ye, Xingqian., Wu, Dan. Identification and characterization of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. *Food Chemistry*. v.128, p.1128-1135, 2011.

Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119(3), 1150–1158, 2010

ANEXOS

Anexo 1

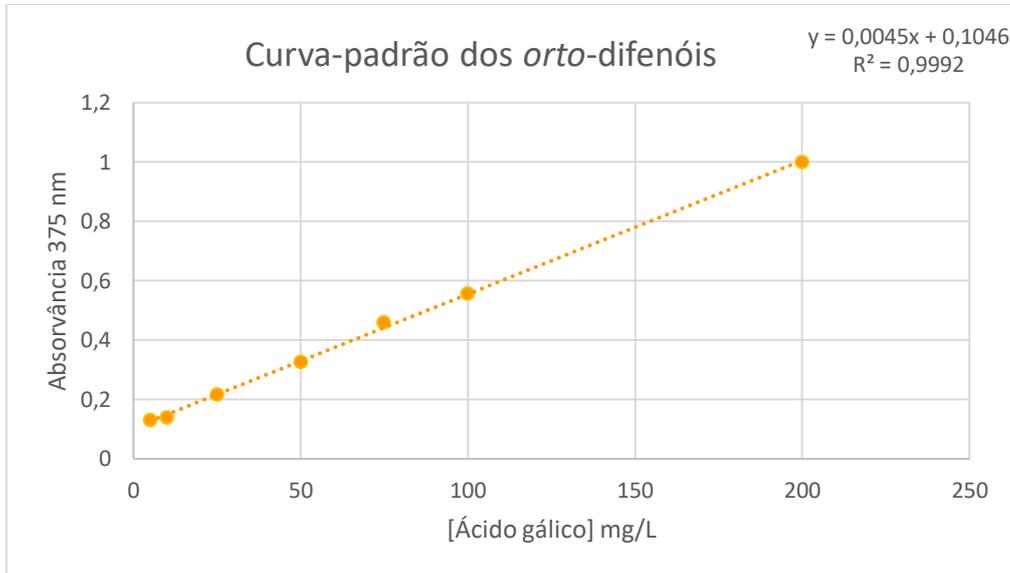


Figura 21: Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar o conteúdo em *orto*-difenóis.

Anexo 2

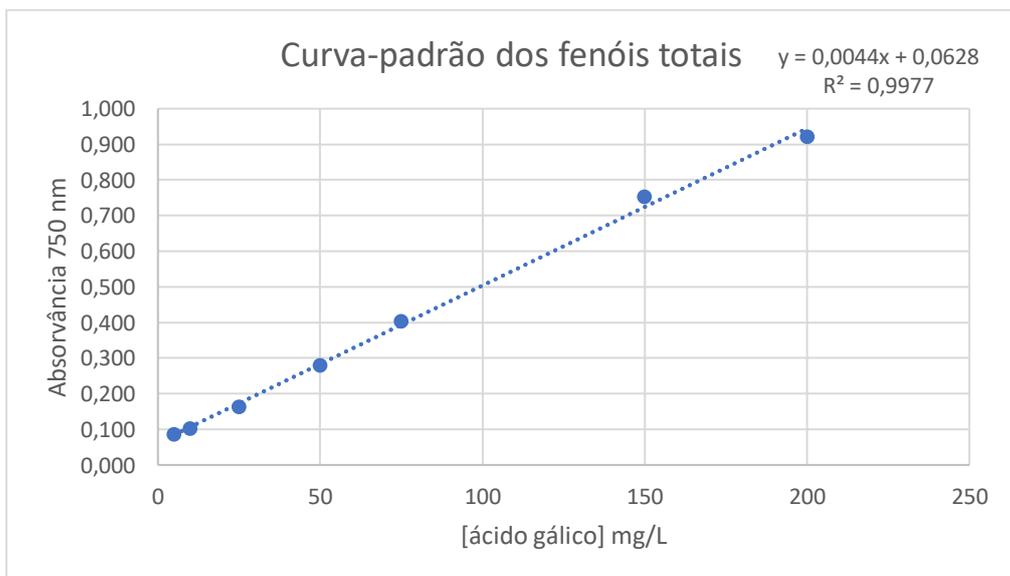


Figura 22: Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar a composição em fenóis totais.

Anexo 3

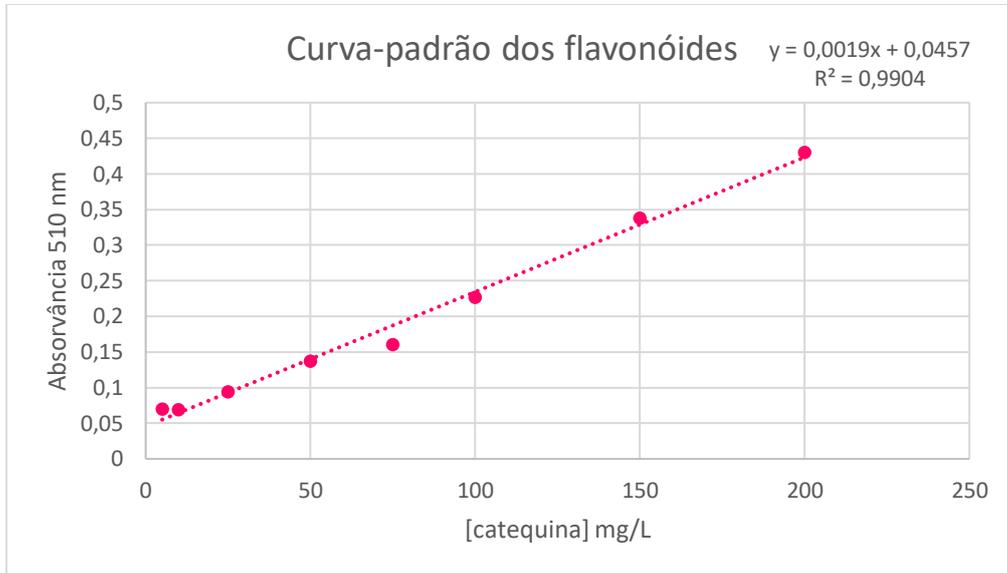


Figura 23: Curvas de calibração de catequina, utilizada para determinar o conteúdo em flavonóides.

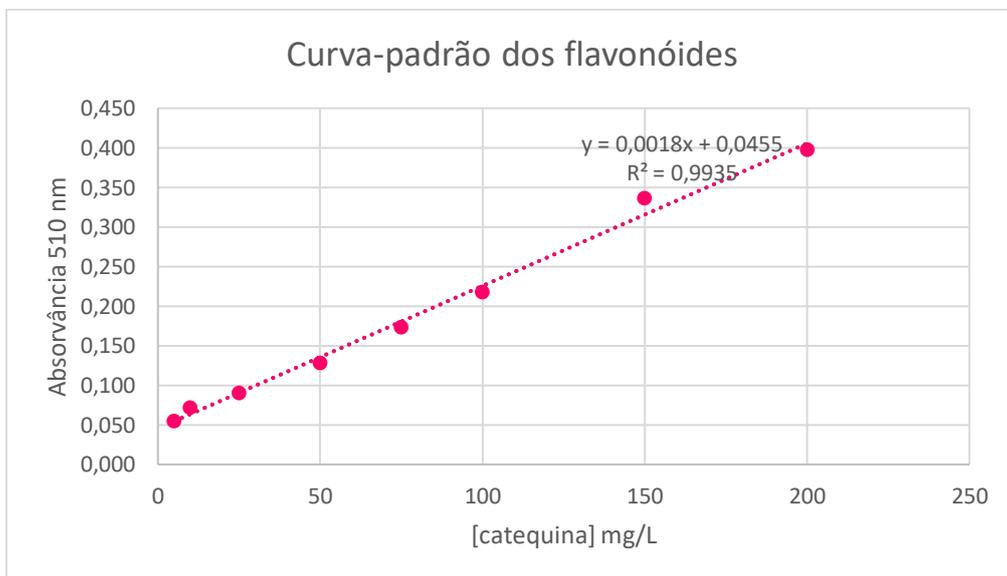


Figura 24: Curvas de calibração de catequina, utilizada para determinar o conteúdo em flavonóides.

Anexo 4

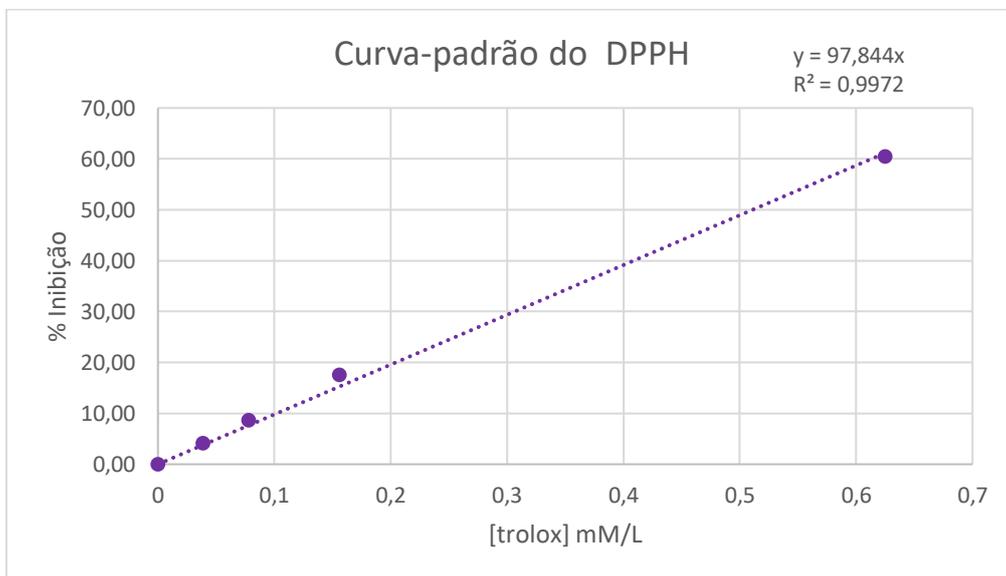


Figura 25: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH)

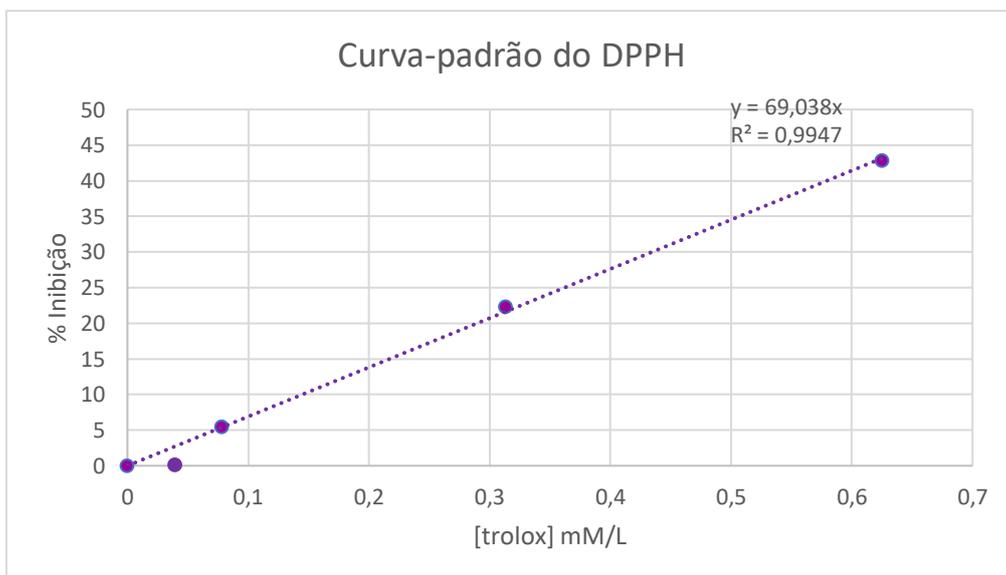


Figura 26: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH)

Anexo 5

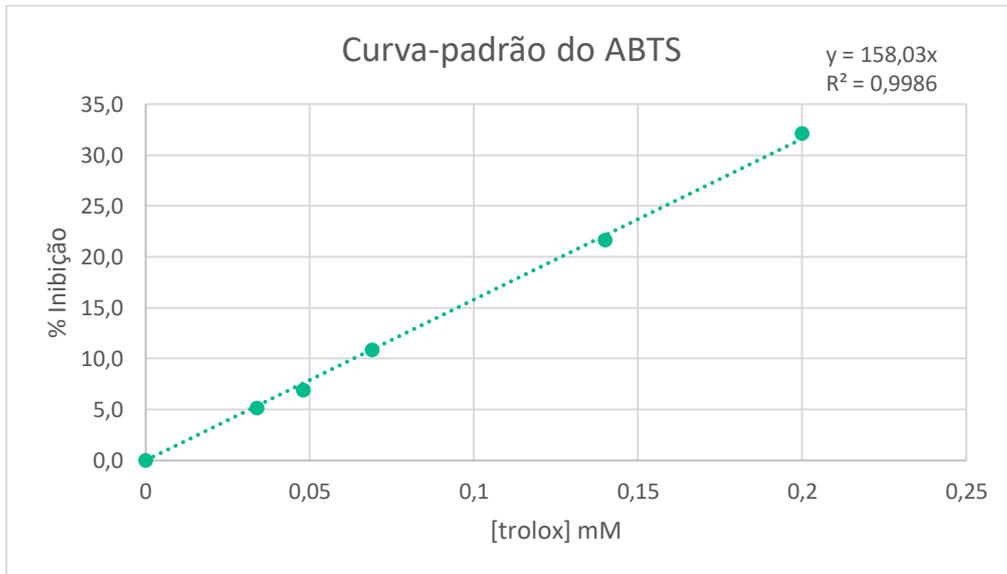


Figura 27: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (ABTS).

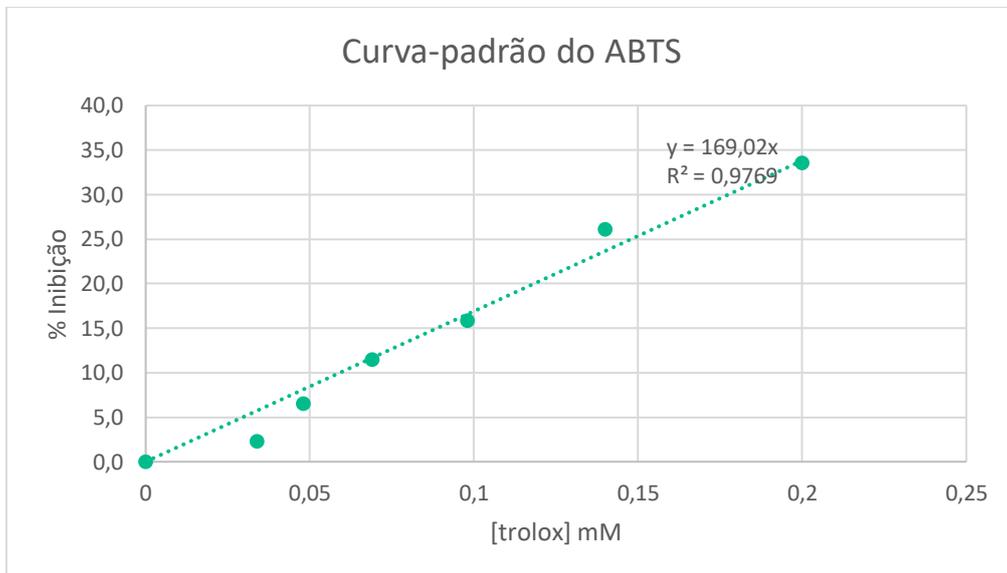


Figura 28: Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (ABTS).

Anexo 6

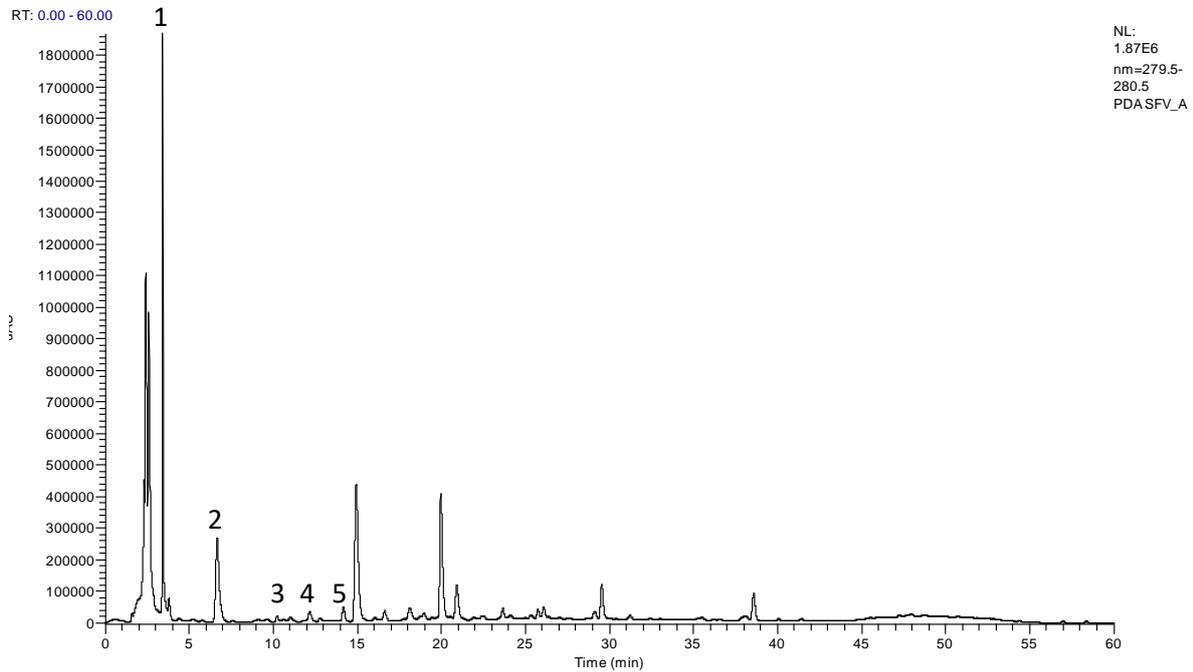


Figura 29: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (detecção a 280 nm). Picos identificados: 1: Ácido gálico (3,42 min); 2: Galocatequina (tr: 6,67 min); 3: Catequina (tr: 10,22 min); 4: Epicatequina (tr: 12,13 min) e 5: Ácido siríngico (tr: 14,17 min).

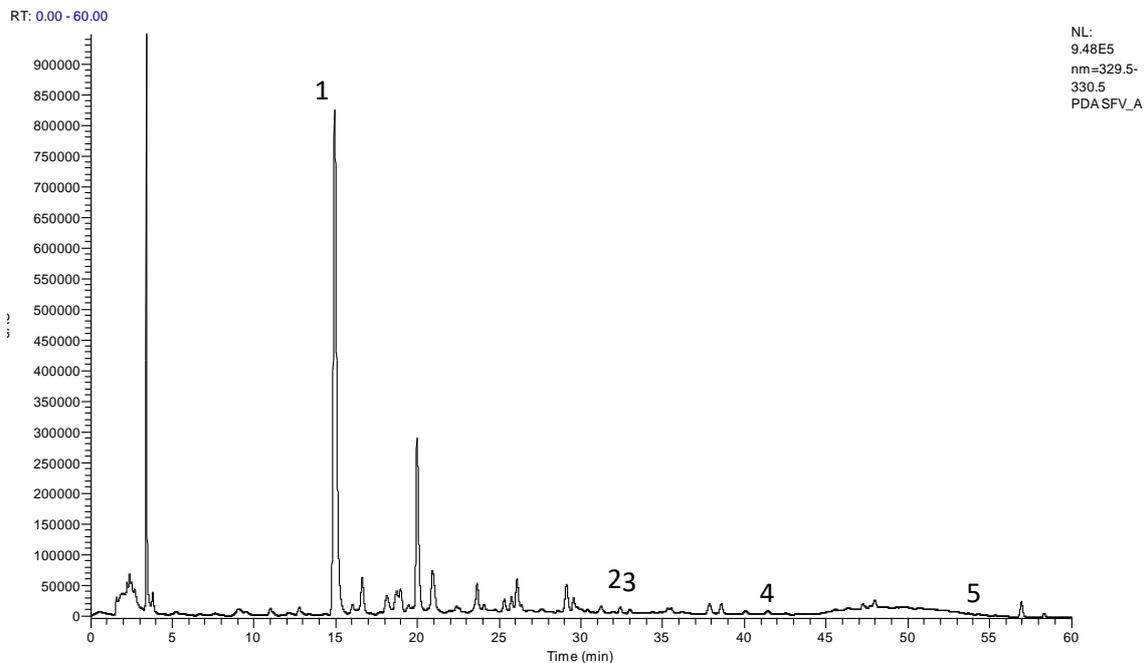


Figura 30: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (detecção a 330 nm). Picos identificados: 1: Ácido caféico (tr: 14,94 min); 2: Kaempferol-3-O-(6"-O-manoil)glicosídeo (tr: 32,40 min); 3: Kaempferol-3-O-(malonil)glicosídeo (tr: 32,97 min); 4: Quercitina (tr: 41,40 min) e 5: Kaempferol (54,28 min).

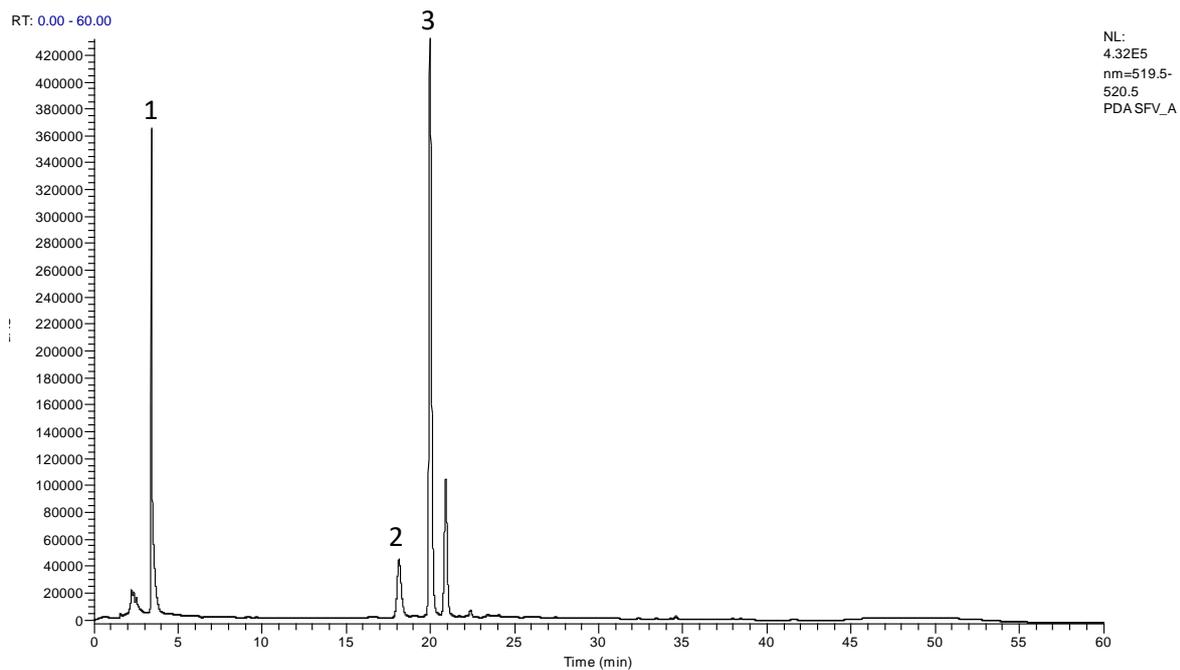


Figura 31: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 22 frutos vermelhos” (deteção a 520 nm). Picos identificados: 1: Delfinidina-3-O-glicosídeo (tr: 3,42 min); 2: Antocianina não identificada (tr: 17,49 min); 3: Antocianina não identificada(tr: 19,16 min)

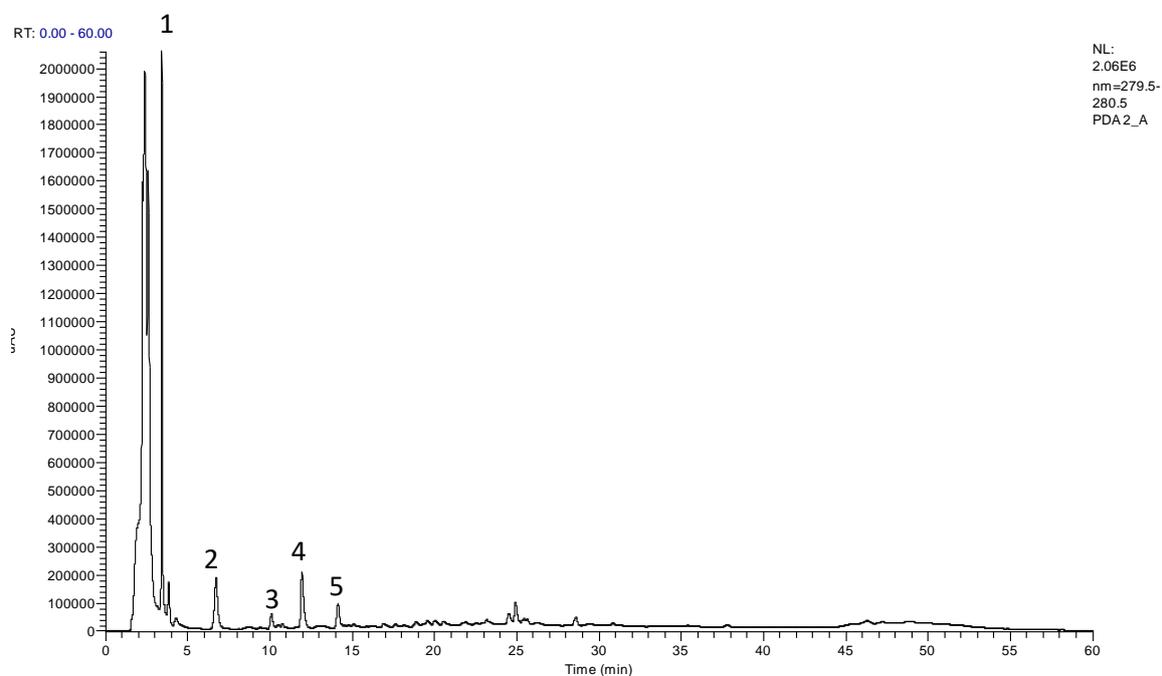


Figura 32: Cromatograma obtido por HPLC-DAD da análise da “cerveja 3 preta” (deteção a 280 nm). Picos identificados: 1: Ácido gálico (tr: 3,43 min); 2: Galocatequina (tr: 6,73 min); 3: Catequina (tr: 10,09 min); 4: Epicatequina (tr: 11,94 min); 5: Ácido siringico (tr: 14,14 min).

Anexo 7

Tabela 11: Percentagem de variabilidade descrita por cada componente principal.

PC1	56,87 %
PC2	26,32 %
PC3	7,19 %
PC4	6,24 %
PC5	3,39 %
