

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS CAMPO MOURÃO-PARANÁ

VALÉRIA RAMPAZZO

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE CERVEJAS COMERCIAIS DE DIFERENTES PROCESSOS
DE FERMENTAÇÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

VALÉRIA RAMPAZZO

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE CERVEJAS COMERCIAIS DE DIFERENTES PROCESSOS
DE FERMENTAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CAMPO MOURÃO
2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CERVEJAS COMERCIAIS DE DIFERENTES PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO

por

VALÉRIA RAMPAZZO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 06 de fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Orientador

Prof. Dr.
Evandro Bona

Prof. Dr.
Paulo Henrique Março

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força e sabedoria durante todos estes anos fazendo com que este sonho se realizasse.

A minha mãe, Maria de Fátima Melo, por ter sido a melhor mãe que uma pessoa poderia ter, me apoiando em absolutamente tudo e não medindo esforços para que eu pudesse concluir este curso, por ser compreensiva e não me deixar desanimar em nenhum momento. Mãe, eu te amo.

Ao meu orientador Prof. Charles, pelo incentivo e companheirismo durante os anos que trabalhamos juntos, e principalmente por ser o responsável por me fazer claro que a carreira acadêmica era a certa para mim. Obrigada por tudo o que fez por mim e desde já, obrigada por me acompanhar ainda durante o mestrado.

Ao meu namorado Fabiano, pela paciência e carinho, me apoiando sempre em minhas decisões.

As minhas amigas, Tatiany, Maria Isabella, Amanda, Thaís, Paula e Ana Gabriela, pelo companheirismo durante toda a graduação. Vocês são demais!

Agradeço Marcos Vieira, pela ajuda técnica, tão importante no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também, a todos os professores da Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos e demais professores das outras coordenações, pelos conhecimentos repassados, assim como aos professores da banca examinadora pelas contribuições referentes a este trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Os compostos fenólicos destacam-se pelas suas diversas propriedades funcionais incluindo poder atuar como antioxidante. Na cerveja, estes compostos além de proporcionarem melhorias nas características sensoriais podem trazer diversos benefícios a saúde relacionados a essa classe de compostos. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de diferentes amostras de cervejas comerciais de dois tipos de processos de fermentação. A análise de compostos fenólicos totais apresentou um maior valor para a amostra de cerveja de fermentação tipo Lager (1088,22 mg EAG.L⁻¹), assim como na análise de flavonóides totais (219,22 mg EC.L⁻¹). Nos testes antioxidantes foram encontrados resultados significativos para atividade antioxidante aplicando o método DPPH, onde a maior capacidade antioxidante (0,25 mg.L⁻¹) foi de uma amostra de cerveja de fermentação tipo Lager, como também demonstrado pelo teste de ABTS (2,28 mg.L⁻¹). De modo geral, a análise de identificação de compostos por meio da CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) identificou vários compostos fenólicos como catequina, ácido ferrúlico, rutina, ácido siríngico e ácido p-cumárico (encontrados em quase todas as amostras) e demonstrou que maiores teores se concentraram nas amostras de cerveja com fermentação tipo Ale. Por meio de análise estatística, foi possível notar correlações entre os testes aplicados como também de alguns compostos fenólicos identificados por CLAE, e a análise estatística multivariada possibilitou agrupar as amostras com suas características mais relevantes.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, atividade antioxidante, CLAE, análise multivariada.

ABSTRACT

Phenolic compounds are characterized by their functional properties including the antioxidant activity. In beers, these compounds can provide improvement in sensory characteristics and also can bring many health benefits related to this class of compounds. This study aimed to evaluate the composition of phenolic compounds and antioxidant capacity of different samples of commercial beers from two distinct types of fermentation processes. The analysis of phenolic compounds showed a higher value for the sample with Lager fermentation (1088,22 mg GAE.L⁻¹) also for the analysis of total flavonoids (219.22 mg EC.L⁻¹). For the antioxidants tests, significant results were found for the antioxidant activity by applying the DPPH method, where the higher antioxidant capacity (0,25 mg.L⁻¹) was from a sample of lager beer fermentation, also shown by the ABTS assay (2,28 mg.L⁻¹). In general, the analysis of identifying compounds by HPLC (high performance liquid chromatography) identified several phenolic compounds such as catechin, ferulic acid, rutin, syringic acid and p-coumaric acid (found in almost all samples) and it demonstrated that higher levels are concentrated in the samples of beer with Ale fermentation. Through statistical analysis, it was possible to observe correlations between the tests that were applied as well as some phenolic compounds identified by HPLC, and the multivariate statistical analysis allowed the classification of the samples according to their relevant features.

Keywords: Phenolic compounds, antioxidant activity, HPLC, multivariate statistical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados na cerveja	17
Figura 2 - Gráfico de dispersão simples (Fator 1 X Fator 2) sobre as principais fontes de variabilidade das cervejas	42
Figura 3 – Dendograma para as cervejas obtido pela análise hierárquica de agrupamentos	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das cervejas	22
Tabela 2 - Concentrações da análise de DPPH	25
Tabela 3 - Concentrações da análise de ABTS.....	26
Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais nas amostras de cervejas	28
Tabela 5 - Teor de flavonóides totais nas amostras de cervejas.....	30
Tabela 6 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de cervejas determinadas pelo método DPPH.....	32
Tabela 7 - CE ₅₀ das amostras de cervejas pelo método DPPH	33
Tabela 8 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de cervejas determinadas pelo método ABTS	35
Tabela 9 - CE ₅₀ das amostras de cervejas pelo método ABTS.....	36
Tabela 10 - Compostos fenólicos identificados por CLAE.....	38
Tabela 11 - Teste de correlação de Pearson	40
Tabela 12 – Dados das cervejas agrupados por compostos fenólicos e atividade antioxidante	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 CERVEJA ARTESANAL BRASILEIRA.....	13
2.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO A FERMENTAÇÃO.....	14
2.2.1 Alta fermentação: tipo Ale	14
2.2.2 Baixa fermentação: tipo Lager.....	15
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS	15
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 METODOLOGIA.....	21
4.1 AMOSTRAS	21
4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	21
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	22
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS.....	23
4.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH• E ABTS•+)	24
4.5.1 DPPH	24
4.5.2 ABTS	25
4.6 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.	26
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	28
5.2 FLAVONÓIDES TOTAIS.....	30
5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
5.3.1 Método DPPH	31
5.3.2 Método ABTS	34
5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE	37
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5.5.1 Teste de correlação de Person	40
5.5.2 Análises multivariadas: ACP e AHC.....	41

6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é tradicionalmente uma bebida consumida em todo o mundo, com baixas calorias e sem gordura, possui ácidos orgânicos, vitaminas (provenientes do malte), proteínas e água. Tem um valor nutricional superior, quando comparada a outras bebidas alcoólicas, devido seus minerais e nutrientes essenciais, tais como potássio, magnésio, cálcio e sódio. A ocorrência natural de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos, deve-se em grande parte a utilização de cereais e malte em sua produção (WEI et al., 2001).

Quando o consumo de álcool é moderado, bebidas como cerveja e vinho podem apresentar benefícios quanto a ocorrência de doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos demonstram que o efeito benéfico a saúde de pessoas que consomem moderadamente estas bebidas é superior ao das pessoas que consomem em alta quantidade ou as que não consomem (BAMFORTH, 2002).

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicaram que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (SILVA et al., 2010).

Estabilidade do flavor é uma das características mais importantes na cerveja e é também um desafio para os cervejeiros já que é um fator essencial na determinação do período de vida útil da cerveja embalada. Visto que um dos principais fatores responsável pela instabilidade de sabor da cerveja é a oxidação ocorrida durante a fabricação, pesquisadores estão buscando alternativas para resolver este problema aumentando a atividade antioxidante endógena da cerveja em si. Embora possam ser usados antioxidantes naturais e sintéticos, como flavonóides, sulfitos e ascorbato para aumentar a estabilidade da cerveja, tem havido uma tendência no sentido de minimizar o uso de aditivos, devido a demanda do consumidor e os regulamentos de endurecimento (ZHAO et al., 2010).

A cerveja possui um relativo baixo teor alcoólico e quando relacionado a quantidade significativa de compostos fenólicos que atuam como antioxidantes, esta pode promover o aumento da capacidade antioxidante do plasma, podendo trazer diversos benefícios a saúde (SIQUEIRA et al., 2008). A partir do momento em que pesquisas comprovem estes benefícios, o valor agregado deste produto torna-se maior, uma vez que mesmo que já haja uma grande procura do produto devido as suas características sensoriais atrativas, o mercado para produtos com propriedades bioativas também esta se tornando cada vez maior no Brasil.

Este trabalho teve como objetivo avaliar se há diferenças quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, capacidade antioxidante e compostos fenólicos isolados, em cervejas fabricadas em microcervejarias brasileiras e obtidas por dois métodos de fermentação, lager e ale.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CERVEJA ARTESANAL BRASILEIRA

A onda de microcervejarias percorreu anteriormente vários países, até chegar ao Brasil, em meados da metade da década de 1980. A partir deste período, apareceram inúmeras microcervejarias, concentradas nas regiões sul e sudeste. Sendo que a maioria delas nascida de comércios voltados para área de alimentos como bares, restaurantes e churrascarias, além das produções caseiras. Essas pequenas produtoras notaram como é interessante produzir cervejas personalizadas de sabor próprio e local, proporcionando assim, a formação de um produto, que popularize a marca de seu estabelecimento (MORADO, 2011).

A produção de cerveja em microescala, mesmo que no Brasil esta prática ainda esteja sendo difundida, aos poucos o comércio vem crescendo, acompanhando as tendências do comércio internacional. A cerveja caracteriza-se como um produto mais encorpado e de aroma e sabor mais pronunciados, onde os principais consumidores são pessoas mais exigentes quanto a qualidade sensorial, que buscam um produto diferenciado, independente do preço (ARAÚJO et al., 2003).

Com a segmentação do Mercado cervejeiro no Brasil e o interesse do consumidor experimentar, cada vez mais novos tipos de cerveja são disponibilizados no mercado, impulsionados pela elevação de ofertas de produtos importados e do número de microcervejarias, que nos últimos anos tem aumentado sua atuação pelo fato de serem empreendimentos lucrativos em um Mercado defasado, monopolizado por pequeno número de grandes indústrias (MORADO, 2011).

2.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO A FERMENTAÇÃO

Segundo a legislação brasileira, Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997, art.64 a art.71, a cerveja pode ser definida como:

“Bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo” (BRASIL, 1997).

Podem ser classificadas como ale ou lager, considerando o tipo de fermentação a que são submetidas durante o processamento (TALUFO et al., 2010).

2.2.1 Alta fermentação: tipo Ale

São as cervejas antigas, isto é, as que eram produzidas antes do domínio da tecnologia da fermentação. Sua fabricação sugere a adição de concentrações mais elevadas de malte e lúpulo, seguida de um envelhecimento de maior duração. Esse tipo de cerveja é obtido pela ação da levedura cervejeira, que surge à superfície da fermentação tumultuosa (flotante) devido a retenção de gás pelas leveduras. A coleta do fermento é feita nesta etapa do processo (CARVALHO, 2007).

São, em geral, de cor clara, com sabor pronunciado de lúpulo, ligeiramente ácidas, e seu teor alcoólico varia de 4% a 8%. O processo de fermentação ocorre entre a temperatura de 15 e 25°C, com duração de 2 a 5 dias (SIQUEIRA et al., 2008).

2.2.2 Baixa fermentação: tipo Lager

As cervejas do tipo Lager são as mais comuns e mais consumidas. A Pilsener ou Pilsen é uma das cervejas mais conhecidas em todo mundo. Originou-se na cidade de Pilsen em 1842, antiga Tchecoslováquia. É caracterizada por ter sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4% a 5%. As cervejas deste grupo são fabricadas por fermentação profunda ou “baixa”, através de processo lento, geralmente em torno de 5 dias (SIQUEIRA et al., 2008).

É a cerveja obtida pela ação da levedura cervejeira, que se deposita no fundo do tanque (floculante), onde o processo ocorre a uma temperatura em torno de 5 e 10°C, após a fermentação tumultuosa. Pode-se citar a Pilsen, que tem cor clara, poucos carboidratos fermentáveis, originalmente fabricada com 100% de malte de cevada e utiliza água com baixo teor de sais dissolvidos (CARVALHO, 2007).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na Natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos podem agir como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (SILVA et al., 2010).

Os flavonóides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas,

isoflavonas e chalconas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente chá, que contém sobretudo catequina em sua composição (SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos destacam-se pelas suas diversas propriedades funcionais (NAKAMURA et al., 2012), e desempenham nas cervejas um papel importante quanto as características sensoriais (cor, aroma e sabor) e nutricionais (FREITAS et al., 2006). Possuem também grande importância tecnológica nas cervejarias, devido a sua influência na estabilidade coloidal e capacidade de interação com proteínas, responsável pela turbidez. Estes compostos estão diretamente relacionados não apenas com a cor, adstringência e nível de oxidação da cerveja, mas são também muito conhecidos pelos seus efeitos como antioxidantes (MARTINEZ et al., 2009).

Entre os antioxidantes consumidos na dieta, compostos fenólicos são de longe os mais abundantes na maior parte das dietas. Estudos epidemiológicos sugerem associações entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a prevenção de muitas doenças como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (HAMINIUK et al., 2012). Baseado na sua ingestão diária, o que excede a de outros compostos antioxidantes (vitamina E, vitamina C, β -caroteno), compostos fenólicos podem ser um fator importante para assegurar o potencial antioxidante da dieta e pode contribuir na manutenção do equilíbrio redox endógena em seres humanos (NARDINI et al., 2006).

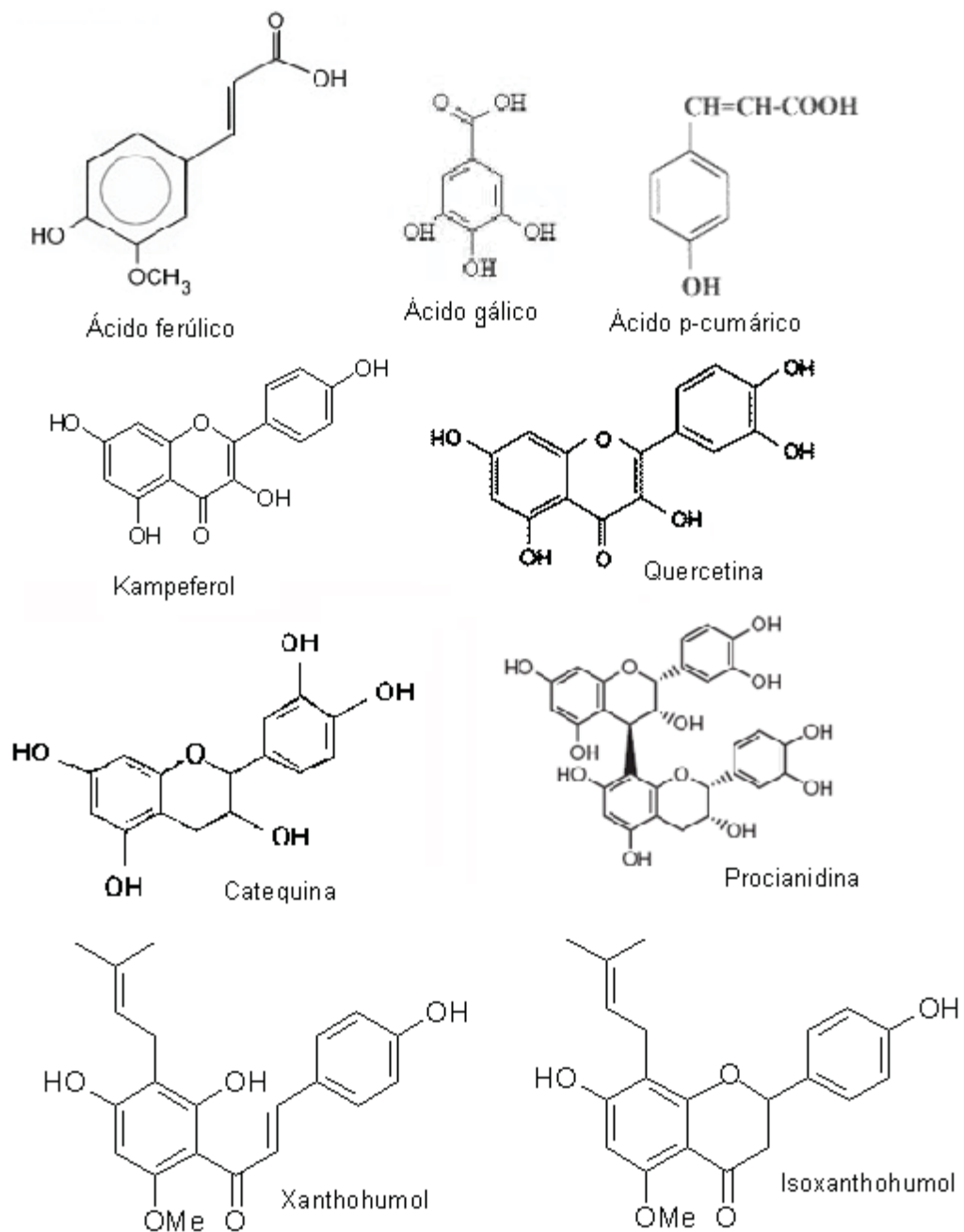


Figura 1- Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados na cerveja

Fonte: Siqueira et al., 2008.

Substâncias ou compostos bioativos são constituintes extra nutricionais, que ocorrem, tipicamente, em pequenas quantidades, especialmente em frutas e hortaliças. Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos desses componentes não essenciais a dieta, encontrados em alimentos de origem vegetal, e englobam mais de 8000 diferentes substâncias (PINELI, 2009).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI et al., 1992).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O processo respiratório e diversas reações oxidativas, que ocorrem nas células aeróbicas, levam à formação de radicais, que causam danos ao organismo e contribuem para o aparecimento de muitas doenças, tais como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, bem como aceleram o processo de envelhecimento. Por isso, as células humanas dependem de certa capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais e espécies reativas do oxigênio, que são conseqüências inevitáveis da vida aeróbica (SILVA et al., 2010).

Antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, em comparação com as de um substrato oxidável atrasam significativamente ou evitam a oxidação do referido substrato. Estes agem de várias maneiras, incluindo a atividade catalítica de íons metálicos, eliminação de radicais e decomposição de peróxidos (HALLIWELL, 2007).

Os processos de oxidação que ocorrem naturalmente no corpo humano contribuem para o desenvolvimento da maioria das principais doenças devido a um sistema de defesa insuficiente. Uma dieta de produtos ricos em componentes oxidados conduz a uma redução do potencial antioxidante ou estado oxidativo em um organismo, aumentando o risco de doenças (BARTOSZ, 2013).

A oxidação em alimentos tem sua origem em mecanismos fisiológicos de processos de oxidação em plantas e animais, os quais são matérias primas para

produtos alimentares. Na cadeia de produção de alimentos, sob a influência de fatores biológicos, ambientais e tecnológicos, aditivos como antioxidantes, são utilizados a fim de alterar o estado de oxidação do produto. A oxidação em alimentos é um processo deteriorante, que altera a qualidade sensorial e valor nutritivo de um produto, representando riscos a saúde, devido a presença de produtos tóxicos (BARTOSZ, 2013).

A atividade antioxidante é a constante de velocidade da reação entre um único antioxidante e um dado radical. A capacidade antioxidante de produtos naturais tem sido quantificada por uma variedade de métodos, e é determinada por vários fatores (CHARLES, 2013).

O atual interesse em antioxidantes devido aos seus benefícios a saúde levou ao desenvolvimento de uma série de pesquisas de capacidade antioxidante. Plantas contém altas concentrações de numerosos metabólitos secundários ou antioxidantes redox-ativo, tais como ácido ascórbico, carotenóides, polifenóis, glutathione, tocoferóis, e enzimas com alta atividade antioxidante que auxiliam contra danos oxidativos (CHARLES, 2013).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH^-) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais. Também bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; protegem a aglomeração plaquetária e inibem a ativação de carcinógenos (RIBEIRO et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de diferentes amostras de cervejas comerciais de dois tipos de processos de fermentação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a quantidade de compostos fenólicos totais;
- Determinar a quantidade de flavonóides totais;
- Avaliar a capacidade antioxidante das amostras pelos métodos de ABTS^{•+} e DPPH[•];
- Identificar compostos fenólicos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar as amostras de cervejas através de testes estatísticos multivariados (PCA e AHA).

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS

Para a realização desta pesquisa, foram selecionadas cinco cervejas de fermentação tipo ale (alta fermentação), onde uma destas é escura e cinco cervejas de fermentação tipo lager (baixa fermentação), onde também uma é escura. Ao longo deste trabalho, as cervejas foram denominadas como cerveja 1 a 10, na ordem mencionada. As cervejas foram adquiridas em comércio local, e todas elas foram fabricadas em diferentes microcervejarias brasileiras.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Em todos os testes químicos, as cervejas foram desgaseificadas por agitação mecânica e filtradas a fim de que não houvesse interferência do gás e da espuma proveniente da fabricação.

Na Tabela 1 é apresentada a composição das 10 cervejas selecionadas, classificadas quanto ao tipo de fermentação, cor, grau alcoólico e componentes base, segundo informações contidas nos rótulos.

Tabela 1 - Composição das cervejas

Amostras	Tipo de fermentação	Cor	Grau alcóolico (% vol)	Componentes base
Cerveja 1	Ale	Clara	5,5	Água, malte de cevada, malte de trigo, levedura e lúpulo
Cerveja 2	Ale	Clara	6,8	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 3	Ale	Clara	5,5	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 4	Ale	Clara	4,9	Água, malte de cevada, malte de trigo levedura e lúpulo
Cerveja 5	Ale	Escura	5,2	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 6	Lager	Clara	4,5	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 7	Lager	Clara	4,8	Água, malte de cevada, farinha de mandioca, levedura e lúpulo
Cerveja 8	Lager	Clara	5,2	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 9	Lager	Clara	4,6	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo
Cerveja 10	Lager	Escura	4,8	Água, malte de cevada, levedura e lúpulo

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão (10-250ppm), de acordo com a metodologia de Singleton & Rossi (1965). Resumidamente, 100 µL de amostra foi misturada com 5000 µL de água destilada, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e foi deixado reagir por 3 minutos. Após, 1500 µL de solução de carbonato de sódio anidro 15% (Na₂CO₃) foi adicionado e completou-se o volume de 10 mL com água destilada. Após a reação de 1 hora a temperatura ambiente, foi lida a absorbância a 760 nm.

As concentrações foram calculadas a partir da curva padrão de ácido gálico, onde foram utilizadas as concentrações de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µL para defini-la, onde gerou um coeficiente de determinação obtida pelo ajuste linear (R²) de 0,986 e a equação da reta conforme apresentada na Equação 1.

Os resultados são expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro de cerveja (mg EAG.L^{-1}).

$$y = 0,0009x - 0,0534 \quad (1)$$

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A quantificação de flavonóides totais seguiu o método colorimétrico proposto por Chang et al (2002), onde 250 μL de extrato foi misturado com 1250 μL de água destilada, 75 μL de solução de nitrito de sódio 5% (NaNO_2) e foi aguardado 6 minutos. Na sequência, 150 μL de solução de cloreto de alumínio 10% (AlCl_3) foi adicionado e foi esperado 5 minutos para a reação. Foi adicionado ainda 500 μL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) e 275 μL de água destilada. A absorbância foi lida a 510nm.

As concentrações foram calculadas a partir da curva padrão de catequina, onde foram utilizadas as concentrações de 0; 20,06; 40,12; 60,12; 80,24; 100,30; 120,36; 140,42; 160,48; 180,54; 200,60; 304,91; 401,20; 505,51 e 601,80 μL para defini-la, onde gerou um coeficiente de determinação obtida pelo ajuste linear (R^2) de 0,999 e a equação da reta conforme apresentada na Equação 2.

Os resultados são expressos em miligramas equivalente de catequina por litro de cerveja (mgEC.L^{-1}).

$$y = 0,0031x + 0,0124 \quad (2)$$

4.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH• E ABTS•+)

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos baseados na capacidade sequestrante de radicais livres, e expressa pelo valor de CE_{50} (concentração efetiva de amostra para seqüestrar 50% de radicais livres).

Os testes aplicados, DPPH• e ABTS•+, tem como mecanismos de reação a eliminação da estabilidade dos radicais DPPH• e ABTS•+ por um antioxidante, provocando a redução deste radical (HAMINIUK et al., 2012).

4.5.1 DPPH

DPPH•, proposto por Mensor et al (2001), onde uma alíquota de 2,5 mL de cada amostra foi misturado com 1 mL do reagente de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e foi aguardado 30 minutos da reação em ambiente escuro ate ser lida a absorbância em 518 nm. 1,0 mL de solução DPPH com 2,5 mL de etanol foi utilizado como controle negativo. A equação do cálculo da capacidade sequestrante de radicais livres pelo método de DPPH é apresentada na equação 3.

$$AA \% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3)$$

As concentrações utilizadas para a realização do CE_{50} são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações da análise de DPPH

mg/L	A	B	C	D	E
1	500	400	300	200	100
2	600	500	400	300	200
3	600	500	400	300	200
4	500	400	300	200	100
5	700	600	500	400	300
6	700	600	500	400	300
7	500	400	300	200	100
8	500	400	300	200	100
9	600	500	400	300	200
10	700	600	500	400	300

4.5.2 ABTS

ABTS^{•+}, de acordo com Thaipong et al (2006), em que 150 µL de extrato foi misturado com 2,85 mL do reagente ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). A reação ocorreu no escuro por 2 horas até ser lida a absorbância a 734 nm. O controle negativo utilizou água no lugar da amostra de cerveja.

A equação do cálculo da capacidade antioxidante pelo método ABTS é apresentado na equação 4.

$$AA \% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (4)$$

As concentrações utilizadas para a realização do CE₅₀ são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações da análise de ABTS

mg/L	A	B	C	D	E
1	200	150	100	50	25
2	300	200	100	50	25
3	200	150	100	50	25
4	300	200	150	100	50
5	350	250	150	100	50
6	350	250	150	100	50
7	300	200	100	50	25
8	200	150	100	50	25
9	300	200	100	50	25
10	300	200	100	50	25

As leituras das absorvâncias de todos os testes, com exceção da análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais foram efetuadas em espectrofotômetro UV-Vis, duplo feixe, T-80 (PG Instruments Limited, Beijing, China) no comprimento de onda específico para cada método.

4.6 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Para que fossem obtidos resultados que expressassem quantitativamente e qualitativamente os compostos fenólicos encontrados nas amostras de cervejas, foi feito uma análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção de diodo (CLAE-DAD/UV-Vis) com sistema Ultimate 3000 CLAE (Dionex, Idstein, Alemanha). Equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna do compartimento de amostra Ultimate 3000, detector de fotodiodo e software Chromeleon foi utilizado. Coluna de fase reversa Acclaim® 120, C18 5 mm 120 A (4,6 mm x 250 mm) foi utilizada para a separação dos compostos fenólicos. A coluna foi mantida a 40°C em todas as análises e os comprimentos de onda utilizados para detecção foram 280, 300 e 320 nm. Ácidos fenólicos e flavonóis são normalmente detectados em comprimentos de onda entre 210 e 320 nm. O volume injetado foi de 10 µL. As fases móveis utilizadas foram

água acidificada com ácido fosfórico 1% e metanol. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada através de gradiente entre as duas fases móveis : 0-15 % B em 2 min, 15-25 % B em 5 min, 25-30 % B em 10 min, 30-35 % B em 15 min, 35-50 % B em 25 min, 50-60 % B em 30 min, 60-80 % B em 35 min, 80-100 % B em 45 min e 100-5 % B em 60 min. Os padrões utilizados para este estudo foram: ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, rutina, trans-cinâmico, miricetina, quercetina, kaempferol) e flavonóis (rutina, miricetina, quercitina e caempferol). As soluções padrões foram preparadas em metanol e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções em duplicatas de pelo menos cinco concentrações. Na análise em CLAE, os compostos fenólicos são identificados comparando o tempo de retenção com os dos padrões puros.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em duplicata, e todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (DP). Todas as variáveis foram submetidas a análise de normalidade pelo teste de Shapiro Wilk's e a análise de homogeneidade de variância pelo teste de Hartley para confirmação do teste de hipóteses. As amostras foram ainda conduzidas ao teste de variância ANOVA, e com as amostras que apresentaram diferença significativa entre si, aplicou-se o teste das médias de Fisher LSD. Foi feito também uma análise de correlação utilizando o teste de Person.

Com o intuito de padronizar as variáveis e agrupá-las quanto as características químicas mais relevantes entre as amostras, foi realizado uma análise multivariada utilizando os teste de ACP (análise de componentes principais) e AHA (análise hierárquica de agrupamentos).

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Quando presentes em níveis elevados, os compostos fenólicos podem transmitir adstringência, amargor e cor aos alimentos, em especial quando os níveis de açúcar são baixos (HAMINIUK et al., 2011).

Na Tabela 4, são apresentados os valores que representam as médias das duplicatas referentes as concentrações de compostos fenólicos totais, expressas em miligramas equivalente de ácido gálico por litro de cerveja. São apresentados também os resultados do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras e os valores dos desvios padrões.

Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais nas amostras de cervejas

Amostras	Concentração (mg EAG.L ⁻¹)	DP
Cerveja 1	662,67 ^g	1,57
Cerveja 2	864,89 ^c	7,86
Cerveja 3	807,11 ^d	3,14
Cerveja 4	673,78 ^g	3,14
Cerveja 5	909,33 ^b	1,57
Cerveja 6	1088,22 ^a	7,86
Cerveja 7	549,89 ^h	7,07
Cerveja 8	723,22 ^f	3,93
Cerveja 9	901 ^b	3,93
Cerveja 10	741,56 ^e	7,86

*Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$

Como pode ser verificado, o teor de compostos fenólicos totais variou entre 549,89 e 1088,22 mg EAG.L⁻¹, sendo a amostra de maior valor a cerveja 6, e a de menor valor a cerveja 7.

Em geral, as cervejas escuras apresentam os maiores valores de compostos fenólicos, resultado que era esperado, pois outros autores como Freitas (2006) e Talufo et al (2010), que também realizaram este teste em amostras de cervejas claras e escuras, verificaram um maior valor em cervejas escuras. Entretanto, nas amostras analisadas, as cervejas escuras (amostras 5 e 10) apresentaram valores altos, mas não superiores as amostras de cervejas claras como as 6 e 9.

Neste teste, a maioria das amostras apresentou diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). Apenas as amostras de cerveja 1 e 4, da mesma classe de fermentação (Ale) e as amostras 5 e 9, de classes diferentes, não apresentaram diferença significativa. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato das amostras serem de diferentes fabricantes e mesmo que os componentes base sejam os mesmos, há diferenças quanto as quantidades, estabelecidas por cada fabricante e origem de cada componente, mesmo que seja adotado o mesmo processo fermentativo.

Os compostos fenólicos presentes na cerveja provêm do lúpulo e, na sua grande maioria, do malte da cevada, fazendo com que a bebida se torne uma boa fonte de compostos fenólicos. Porém, os compostos derivados do lúpulo são mais fáceis de serem caracterizados que os da cevada, pois durante o processamento da bebida eles podem sofrer mudanças, tornando-os de difícil caracterização (MACIEL et al., 2013).

Gasowski et al (2004) constataram que a cerveja tem um efeito benéfico sobre o perfil de lípidios no plasma e a capacidade antioxidante do plasma . O grau dessa influência benéfica da cerveja está diretamente relacionado aos compostos bioativos presentes nela.

A presença de compostos fenólicos na cerveja pode proporcionar 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 (MACIEL et al., 2013).

5.2 FLAVONÓIDES TOTAIS

Fontes alimentares ricas em flavonóides podem ser uma boa fonte de antioxidantes, ajudando a aumentar a capacidade antioxidante total de um organismo e protegê-lo contra peroxidação lipídica (SAHREEN et al., 2010).

Na Tabela 5, são apresentados os valores que representam as médias das duplicatas referentes as concentrações de flavonóides totais, expressas em miligramas equivalente de catequina por litro de cerveja. São apresentados também os resultados do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras e os valores dos desvios padrões.

Tabela 5 - Teor de flavonóides totais nas amostras de cervejas

Amostras	Concentração (mg EC.L⁻¹)	DP
Cerveja 1	52,45 ^f	0,46
Cerveja 2	71,32 ^c	1,59
Cerveja 3	77,93 ^b	2,28
Cerveja 4	49,39 ^f	0,68
Cerveja 5	76,81 ^b	1,14
Cerveja 6	219,22 ^a	0,46
Cerveja 7	61,64 ^d	0,28
Cerveja 8	58,09 ^e	2,96
Cerveja 9	79,55 ^b	1,82
Cerveja 10	52,77 ^f	1,37

*Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fisher LSD

Como é visto na Tabela 5, o teor de flavonóides totais variou entre 49,39 e 219,22 mg EC.L⁻¹, sendo a amostra com maior teor a cerveja 6 e a menor a cerveja 4. A amostra 6 demonstrou que grande parte dos compostos fenólicos totais encontrados são flavonóides, devido ao valor superior as outras amostras, semelhante a análise de compostos fenólicos. As cervejas escuras, também como a

análise de compostos fenólicos, não apresentaram valores superiores as cervejas claras, embora terem apresentado valores altos.

Quanto as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras, resultado semelhante ocorreu entre este teste e a análise de compostos fenólicos totais, onde as amostras 5 e 9 não apresentaram diferença significativa e as amostras 1 e 4 que também não havia apresentado diferença significativa, agora também inclui a amostra 10. As demais amostras apresentaram diferença significativa entre si.

Os flavonóides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonóides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (BEHLING et al., 2004).

O flavonóide presente na cerveja que se destaca é a rutina. Este flavonóide acaba por produzir efeitos benéficos associados à elevação na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, diminuindo os fatores de risco para aterosclerose e doenças cardiovasculares, além da elevação do colesterol-HDL (MACIEL et al., 2013).

5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1 Método DPPH

Na Tabela 6, estão representados os valores das médias das duplicatas das amostras de cerveja, referentes a atividade antioxidante (AA%) pelo método DPPH, calculado conforme a equação 3, para cada uma das cinco concentrações escolhidas para efetuar o cálculo de CE_{50} . São apresentados também, os valores dos desvios padrões de cada concentração.

Tabela 6 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de cervejas determinadas pelo método DPPH

	Amostra	AA%	DP		Amostra	AA%	DP
Cerveja 1	C1-1	83,67	1,29	Cerveja 2	C2-1	83,01	0,36
	C1-2	81,69	0,79		C2-2	81,69	0,07
	C1-3	76,52	0,21		C2-3	79,31	0,14
	C1-4	74,18	0,36		C2-4	78,54	0,50
	C1-5	69,62	1,22		C2-5	75,55	0,14
Cerveja 3	C3-1	81,08	0,21	Cerveja 4	C4-1	81,49	0,07
	C3-2	80,17	0,21		C4-2	79,61	0,14
	C3-3	78,09	0,14		C4-3	79,05	0,21
	C3-4	75,96	0,14		C4-4	75,55	0,28
	C3-5	75,25	0,28		C4-5	71,95	0,50
Cerveja 5	C5-1	81,13	0,14	Cerveja 6	C6-1	72,71	0,14
	C5-2	80,78	0,21		C6-2	69,72	0,07
	C5-3	79,31	0,28		C6-3	69,57	0,14
	C5-4	77,94	0,07		C6-4	66,73	0,14
	C5-5	76,06	0,14		C6-5	64,75	0,21
Cerveja 7	C7-1	85,59	0,57	Cerveja 8	C8-1	85,29	0,43
	C7-2	83,62	0,36		C8-2	82,86	0,28
	C7-3	81,99	0,64		C8-3	82,15	0,28
	C7-4	79,61	0,28		C8-4	79,00	0,14
	C7-5	77,63	0,64		C8-5	77,83	0,21
Cerveja 9	C9-1	74,13	0,43	Cerveja 10	C10-1	81,79	0,35
	C9-2	71,80	0,14		C10-2	79,97	0,35
	C9-3	68,30	0,50		C10-3	79,41	0,43
	C9-4	66,17	0,07		C10-4	78,49	0,57
	C9-5	64,14	0,07		C10-5	75,25	0,14

Na Tabela 7, estão os valores médios do cálculo de CE_{50} , expressos em miligramas por litro de cerveja, calculados a partir da equação de regressão ajustado para cada duplicata das amostras de cerveja. São apresentados também o resultado do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras,

os desvios padrões e coeficientes de coeficientes de determinação obtidos pelo ajuste não linear.

Tabela 7 - CE₅₀ das amostras de cervejas pelo método DPPH

Amostras	CE₅₀ (mg/L)	DP	R²
Cerveja 1	11,65 ^c	0,60	0,96
Cerveja 2	4,25 ^{d, e}	0,76	0,97
Cerveja 3	2,62 ^e	0,16	0,93
Cerveja 4	2,51 ^e	0,36	0,98
Cerveja 5	4,52 ^{d, e}	0,21	0,98
Cerveja 6	58,79 ^a	3,13	0,95
Cerveja 7	0,39 ^e	0,05	0,94
Cerveja 8	0,25 ^b	0,02	0,91
Cerveja 9	46,76 ^e	1,19	0,94
Cerveja 10	7,66 ^{c, d}	0,09	0,94

*Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fisher LSD

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀) (SOUSA et al, 2007).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5 pode-se observar que a amostra com maior concentração efetiva necessária para seqüestrar 50% dos radicais livres, em miligramas por litro de cerveja, foi a cerveja 6 (58,79 mg. L⁻¹) e a que apresentou a menor concentração foi a cerveja 8 (0,25 mg.L⁻¹).

Segundo esses valores, amostras como a 6 e a 9 que apresentaram maiores teores, significa que sua capacidade sequestrante de radicais é menor quando comparado as outras amostras.

Comparando com os resultados de compostos fenólicos totais pode-se observar que a amostra 6, que apresentou o maior teor de compostos fenólicos é a

que apresentou menor capacidade antioxidante. Isso pode ter ocorrido pelo fato de uma grande quantidade de ácidos fenólicos presentes na amostra não atuarem como antioxidantes. Já as amostras 7 e 8, que não foram as que apresentaram os maiores valores de compostos fenólicos totais, são as que possuem maior capacidade antioxidante segundo este método.

Diferente das análises de compostos fenólicos e flavonóides, as amostras apresentaram maior semelhança estatística entre uma maior variedade de marcas. Amostras como 2, 3, 4, 5, 7 e 9 não apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre si, sendo estas amostras de ambos os processos fermentativos, assim como as amostras 1 e 10 que também apresentaram semelhança estatística.

A cerveja é uma bebida que possui capacidade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos, associada a um relativo baixo teor alcoólico. Desta forma ela promove o aumento da capacidade antioxidante do plasma sem os efeitos negativos provocado pelo consumo de altas doses de etanol contido nesta bebida (SIQUEIRA et al., 2008).

5.3.2 Método ABTS

Na Tabela 8, estão representados os valores das médias das duplicatas das amostras de cerveja, referentes a atividade antioxidante (AA%) pelo método ABTS, calculado conforme a equação 4, para cada uma das cinco concentrações escolhidas para efetuar o cálculo de CE_{50} . São apresentados também, os valores dos desvios padrões de cada concentração.

Tabela 8 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de cervejas determinadas pelo método ABTS

	Amostra	AA%	DP		Amostra	AA%	DP
Cerveja 1	C1-1	94,65	0,27	Cerveja 2	C2-1	87,69	0,61
	C1-2	88,67	0,20		C2-2	85,07	0,20
	C1-3	76,89	1,99		C2-3	72,51	0,48
	C1-4	63,32	1,10		C2-4	69,60	0,48
	C1-5	52,18	0,48		C2-5	54,04	0,61
Cerveja 3	C3-1	97,47	0,69	Cerveja 4	C4-1	92,46	1,44
	C3-2	81,81	1,10		C4-2	87,40	0,76
	C3-3	76,31	0,75		C4-3	81,03	0,82
	C3-4	64,06	1,03		C4-4	74,95	0,75
	C3-5	50,39	2,48		C4-5	63,67	0,21
Cerveja 5	C5-1	95,91	0,41	Cerveja 6	C6-1	95,81	1,1
	C5-2	86,82	0,34		C6-2	85,21	1,51
	C5-3	76,17	0,55		C6-3	68,72	0,34
	C5-4	69,99	1,03		C6-4	51,84	0,41
	C5-5	57,24	1,03		C6-5	43,19	0,96
Cerveja 7	C7-1	95,81	1,10	Cerveja 8	C8-1	60,31	0,55
	C7-2	95,04	0,55		C8-2	91,48	0,20
	C7-3	85,60	0,13		C8-3	88,42	0,27
	C7-4	74,56	0,20		C8-4	81,81	0,13
	C7-5	67,85	0,20		C8-5	72,57	0,82
Cerveja 9	C9-1	93,38	0,96	Cerveja 10	C10-1	93,48	0,13
	C9-2	86,87	0,41		C10-2	89,73	0,34
	C9-3	76,26	0,41		C10-3	84,09	0,20
	C9-4	67,26	0,75		C10-4	73,68	0,07
	C9-5	54,18	0,27		C10-5	67,89	0,55

Na Tabela 9, estão os valores médios do cálculo de CE_{50} , expressos em miligramas por litro de cerveja, calculados a partir da equação de regressão ajustado para cada duplicata das amostras de cerveja. São apresentados também o resultado do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras,

os desvios padrões, coeficientes de correlação e coeficientes de determinação obtidos pelo ajuste não linear.

Tabela 9 - CE₅₀ das amostras de cervejas pelo método ABTS

Amostras	CE ₅₀ (mg/L)*	DP	R ²
Cerveja 1	24,37 ^c	1,29	0,99
Cerveja 2	15,39 ^{d, e}	0,94	0,96
Cerveja 3	25,76 ^c	2,44	0,96
Cerveja 4	6,28 ^f	0,14	0,98
Cerveja 5	35,94 ^b	0,81	0,99
Cerveja 6	73,63 ^a	2,49	0,96
Cerveja 7	13,19 ^e	0,73	0,97
Cerveja 8	2,28 ^g	0,19	0,98
Cerveja 9	17,96 ^d	0,11	0,99
Cerveja 10	4,74 ^{f, g}	0,42	0,99

*Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fischer LSD

Quanto menor o valor de CE₅₀ apresentado na amostra, menor quantidade de composto será necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH e ABTS. Ou seja, quanto maior o consumo de DPPH ou ABTS por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 9, nota-se que a amostra 6 apresentou resultado semelhante a análise da capacidade antioxidante pelo método de DPPH, possuindo menor capacidade antioxidante precisando de 73,63 mg/L para seqüestrar 50% dos radicais livres. A amostra 8 também apresentou resultado semelhante ao outro método, possuindo a maior capacidade antioxidante precisando de 2,28 mg/L para seqüestrar 50% dos radicais livres.

As demais amostras apresentaram valores relativamente pequenos de CE₅₀, ou seja, possuem boa capacidade antioxidante segundo os métodos avaliados (DPPH e ABTS).

Diferente do teste antioxidante de DPPH, a análise de ABTS apresentou um maior número de amostras com diferenças significativas ($p \leq 0,05$). São estas amostras, cervejas 1 e 3, a amostra 2 que apresentou semelhança estatística com as amostras 7 e 9 e a amostra 10 que apresentou semelhança com as amostras 4 e 8. A cerveja é uma mistura de compostos naturais, atividades e mecanismos antioxidantes presentes nela dependeria grande parte da composição e condições do sistema de teste, assim, diferentes métodos que avaliam a atividade antioxidante com base em diferentes mecanismos de reação podem originar vários resultados diferentes (ZHAO et al., 2010).

Comparando os valores de compostos fenólicos totais e antioxidantes pelos métodos de DPPH e ABTS, pode ser notado que as amostras que apresentaram os maiores valores de compostos fenólicos totais não foram as mesmas que apresentaram maior capacidade antioxidante.

Compostos fenólicos não precisam necessariamente atuar como antioxidantes, e no caso das amostras de cervejas, alguns compostos encontrados dentro dos compostos fenólicos totais não se comportam como antioxidantes.

Há vários estudos sobre a atividade antioxidante e conteúdo fenólico de cervejas, entretanto estas pesquisas dispõem de dados limitados sobre o perfil fenólico e a contribuição destes para a atividade antioxidante em cervejas comerciais. Além disso, é difícil comparar dados de literatura, devido a falta de concordância sobre o método adequado para a análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante (ZHAO et al., 2010).

O conhecimento das propriedades antioxidantes dos produtos de nosso consumo diário pode direcionar a população apropriadamente na escolha de um produto com maior poder medicinal (MORAIS et al., 2009).

5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

Os espectros de absorção UV-vis de compostos fenólicos permitem a identificação de picos cromatográficos e sua classificação. Uma combinação destes

dados com os espectros de massa e informações a partir da literatura pode ser usada para tentar identificar a estrutura de polifenóis (YANG et al., 2011).

A tabela 10 apresenta os valores dos compostos fenólicos identificados nas amostras de cerveja, de acordo com os padrões utilizados.

Tabela 10 - Compostos fenólicos identificados por CLAE

	Ác. gálico (mg/L)	Catequina (mg/L)	Ác. siríngico (mg/L)	Ác. cafêico (mg/L)	Ác. trans-cinâmico (mg/L)	Ác. p-cumárico (mg/L)	Rutina (mg/L)	Ác. ferrúlico (mg/L)	Total (mg/L)
1*	24,77	10,58							35,35
2	38,5	17,98	0,42	1,59			3,14	3,45	65,08
3	27,98	17,77	0,86			1,57	1,09	3,98	53,25
4	23,73	10,34							34,07
5	40,56	15,37	0,68			1,62		4,32	62,55
6		17,82			0,17	1,92		3,66	23,57
7		16,40			0,13		0,95	1,34	18,82
8		18,58	0,99			1,78		7,73	29,08
9		21,91			0,27	1,72		3,84	27,74
10		17,17							17,17

*As amostras de cerveja estão nomeadas de 1 a 10

A partir dos resultados obtidos por meio da análise de compostos isolados, pode-se observar que compostos como catequina, ácido ferrúlico, rutina, ácido siríngico e ácido p-cumárico foram identificados em quase todas as amostras de cerveja. Outros autores como Zhao et al (2010) e Nardini et al (2006), também identificaram estes compostos em amostras de cervejas comuns.

Uma diferença significativa entre os resultados foi a presença de ácido gálico, identificado apenas nas amostras de cervejas com fermentação do tipo Ale (alta fermentação). Não foram encontradas pesquisas relacionadas, que apresentaram explicações sobre esta diferença, ou alguma diferença entre os compostos isolados de cervejas com processos fermentativos diferentes. No entanto, é um fato interessante e de grande importância, pois o ácido gálico, dentro da classe de compostos fenólicos é um composto de grande importância, largamente estudado pelas suas propriedades benéficas e que se apresenta nas fontes naturais mais importantes de compostos fenólicos.

Em geral, comparando o valor total de compostos fenólicos isolados identificados, nota-se que as amostras de cerveja com fermentação tipo Ale apresentou valores superiores aos das amostras de cerveja com fermentação tipo Lager.

Em grãos de cevada, têm sido identificados derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, como o ácido trans-ferrúlico, encontrado em maior quantidade no grão, seguido dos ácidos p-cumarínico e vanílico. Esses ácidos são conhecidos por atuarem como antioxidantes primários na recepção de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia e encontram-se presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão (BEZERRA, 2013).

Em pesquisa recente, compostos fenólicos como a rutina, ácido cafêico, ácido ferúlico e miricetina, foram identificados e quantificados em diferentes cultivares de cevada brasileira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, do inglês 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 em sua forma livre, e algumas substâncias apresentarão maior possibilidade de serem encontradas ou no malte ou no lúpulo. Os derivados de ácidos hidrobenczóicos e ácidos hidroxinâmicos, como, por exemplo, os ácidos ferrúlico, para-cumárico e cafêico (identificados pelos testes), são extraídos mais comumente do malte, enquanto do lúpulo provêm os flavonóis, chalconas e flavanonas. Igualmente detectáveis, tanto no lúpulo quanto no malte, são os taninos derivados de flavonóis, as catequinas e procianidinas (MACIEL et al., 2013).

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.5.1 Teste de correlação de Person

Por meio da análise estatística de correlação de Person ($p \leq 0,05$) foi possível observar através dos resultados obtidos que as análises realizadas obtiveram correlação significativa entre si. Estas correlações são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Teste de correlação de Pearson

mg/L	CFT	FT	DPPH	ABTS	Ác. Gálico	Catequina	Ác. Siríngico	Ác. Cafeico	Ác. Ferrúlico	Rutina	Ác. p-cumárico	Ác. Trans-cinâmico
CFT	1.0000											
FT	p=---	1.0000										
DPPH	p=0.00	p=---	1.0000									
ABTS	p=0.00	p=0.00	p=---	1.0000								
Ác. Gálico	p=0.00	p=0.00	p=0.01	p=---	1.0000							
Catequina	p=0.737	p=0.294	p=0.058	p=0.886	p=---	1.0000						
Ác. Siríngico	p=0.44	p=0.215	p=0.084	p=0.736	p=0.056	p=---	1.0000					
Ác. Cafeico	p=0.0941	p=0.1561	p=0.4359	p=0.1176	p=0.383	p=0.2509	p=---	1.0000				
Ác. Ferrúlico	p=0.693	p=0.511	p=0.055	p=0.621	p=0.145	p=0.286	p=0.0772	p=---	1.0000			
Rutina	p=0.1651	p=0.0601	p=0.1621	p=0.1100	p=0.4620	p=0.1621	p=0.746	p=0.746	p=---	1.0000		
Ác. p-cumárico	p=0.487	p=0.801	p=0.495	p=0.644	p=0.040	p=0.495	p=0.693	p=0.1297	p=0.586	p=---	1.0000	
Ác. Trans-cinâmico	p=0.3348	p=0.2434	p=0.1553	p=0.632	p=0.2326	p=0.6756	p=0.001	p=0.9092	p=0.1441	p=---	p=---	1.0000
	p=0.149	p=0.301	p=0.513	p=0.824	p=0.324	p=0.001	p=0.1676	p=0.9092	p=0.1441	p=---	p=---	p=---
	p=0.0107	p=0.1012	p=0.2892	p=0.1296	p=0.4439	p=0.2121	p=0.480	p=0.000	p=0.544	p=---	p=---	p=---
	p=0.964	p=0.671	p=0.216	p=0.586	p=0.050	p=0.369	p=0.5373	p=0.2794	p=0.3707	p=0.170	p=---	p=---
	p=0.5840	p=0.3235	p=0.2169	p=0.4569	p=0.2020	p=0.2780	p=0.015	p=0.233	p=0.108	p=0.170	p=---	p=---
	p=0.007	p=0.164	p=0.358	p=0.043	p=0.393	p=0.235	p=0.4612	p=0.2031	p=0.1745	p=0.1927	p=---	p=---
	p=0.3524	p=0.4669	p=0.7918	p=0.3442	p=0.5809	p=0.5428	p=0.041	p=0.390	p=0.462	p=0.416	p=0.629	p=---
	p=0.128	p=0.038	p=0.000	p=0.137	p=0.007	p=0.013	p=0.041	p=0.390	p=0.462	p=0.416	p=0.629	p=---

5.5.2 Análises multivariadas: ACP e AHC

A Análise de Componentes Principais (ACP) representa uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas, principalmente, devido às suas características muito atraentes. 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 em um espaço n-dimensional, através da identificação das direções em que a maior parte da informação é mantida, permitindo que a relação entre as variáveis e as observações a serem estudadas, bem como o reconhecimento da estrutura de dados. É, por conseguinte, possível para explicar as diferenças nas várias 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.

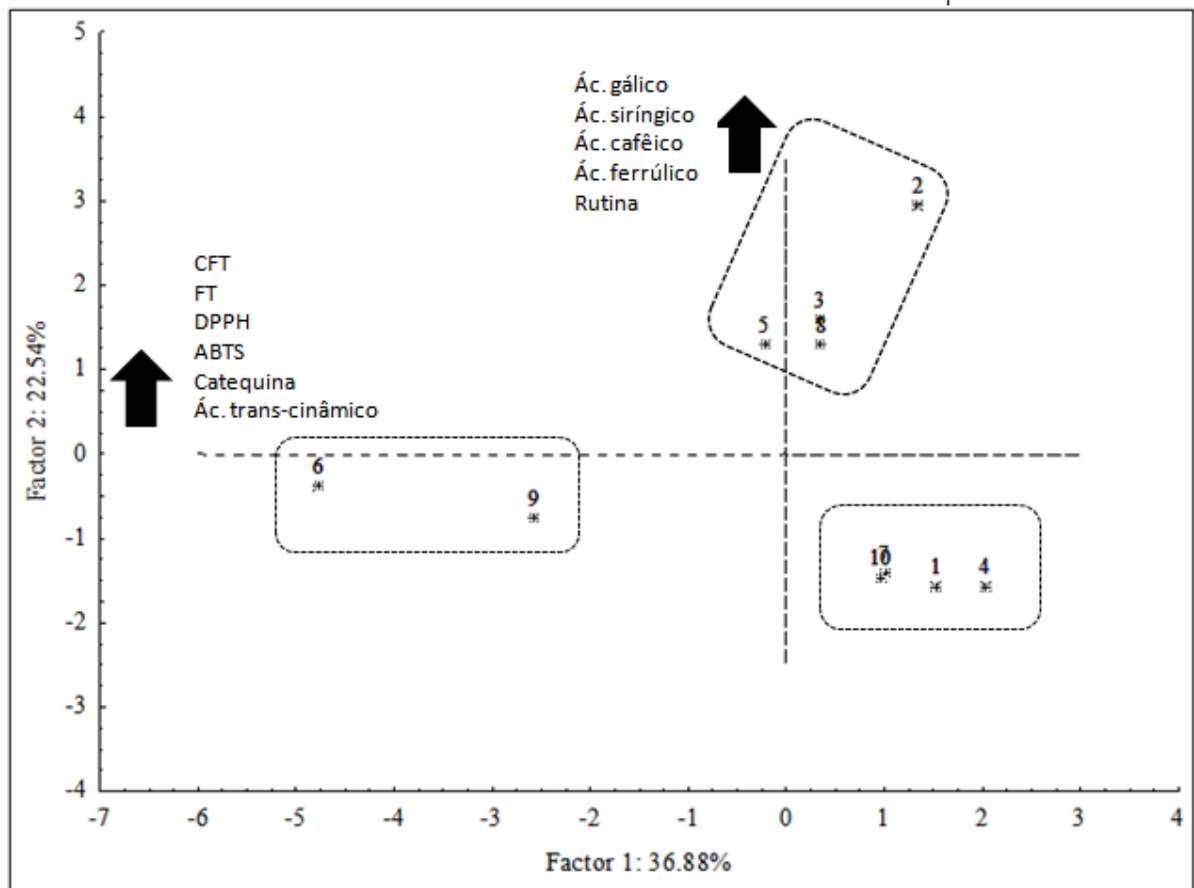


Figura 2 - Gráfico de dispersão simples (Fator 1 X Fator 2) sobre as principais fontes de variabilidade das cervejas

A ACP foi aplicada em ordem de avaliar os dados dos principais compostos fenólicos determinados por CLAE, fenóis totais, flavonóides totais e atividade antioxidante. O primeiro fator foi capaz de explicar 36,88% da variância total e o segundo explicou 22,54%, totalizando 59,42%. As amostras foram separadas ao longo do primeiro fator pelas diferenças observadas nos compostos fenólicos totais, flavonóides totais, DPPH, ABTS, catequina e ácido trans-cinâmico. O segundo fator separou as amostras relacionadas a ácido gálico, ácido siríngico, ácido cafêico, ácido ferrúlico e rutina.

O gráfico de dispersão simples sugere a localização das cervejas em relação a composição fenólica e a atividade antioxidante e foi possível observar a formação de três grupos. O grupo da esquerda apresentou os maiores teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, DPPH, ABTS, catequina e ácido trans-cinâmico, enquanto que o grupo do quadrante positivo os maiores teores de ácido gálico, ácido

siríngico, ácido cafêico, ácido ferrúlico e rutina. O outro grupo formado foi o que mostrou os menores teores dos compostos determinados.

A similaridade das amostras foi avaliada usando análise hierárquica de agrupamentos (AHA) e três grupos foram sugeridos (Figura 3), no qual corroboram com os resultados encontrados pela ACP, a as médias para cada variável resposta foi comparada estatisticamente (Tabela 12). As amostras agrupadas nos clusters foram submetidas à análise de homogeneidade de variância pelo teste Hartley para mais que dois grupos e o teste F para dois grupos. Valores de $p \geq 0,05$ foram considerados paramétricos e valores de $p \leq 0,05$ não paramétricos.

Por meio da separação dos grupos, é possível observar que no Cluster 1, estão incluídas as amostras que apresentaram menores teores de CFT (compostos fenólicos totais), FT (flavonóides totais), capacidade antioxidante intermediária pelo teste de DPPH e menor teor de ácido ferrúlico entre os três grupos. Este grupo está dividido entre duas amostras de fermentação tipo Ale (amostras 1 e 4) e duas amostras de fermentação tipo Lager (amostras 7 e 10).

No Cluster 2, estão contido as amostras que apresentaram valores intermediários de CFT (compostos fenólicos totais), FT (flavonóides totais), maior capacidade antioxidante pelo método de DPPH e maior teor de ácido ferrúlico identificado entre os três grupos. Estão neste grupo uma maior parte de amostras com fermentação tipo Ale (amostras 2, 3 e 5) e apenas a amostra 8 da outra classe fermentativa.

Os maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides, e menor capacidade antioxidante encontram-se nas amostras presentes no Cluster 3, representadas pelas amostras de fermentação Lager (amostras 6 e 9).

Segundo este teste, as amostras de cerveja com maior conteúdo de compostos fenólicos totais estão agrupadas no Cluster 3 e compreendem as amostras que representam o processo fermentativo Lager, entretanto a análise de compostos fenólicos individuais por CLAE, demonstra que as amostras de cerveja com fermentação tipo Ale são as que apresentaram maiores teores. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que na análise de compostos fenólicos totais são identificados todos os ácidos fenólicos contidos nas amostras enquanto que na análise de CLAE são identificados apenas os compostos no qual tínhamos o padrão. Logo, não é possível fazer uma correlação conclusiva sobre a afirmação da

análise por CLAE sobre os resultados obtidos pelo teste de compostos fenólicos totais.

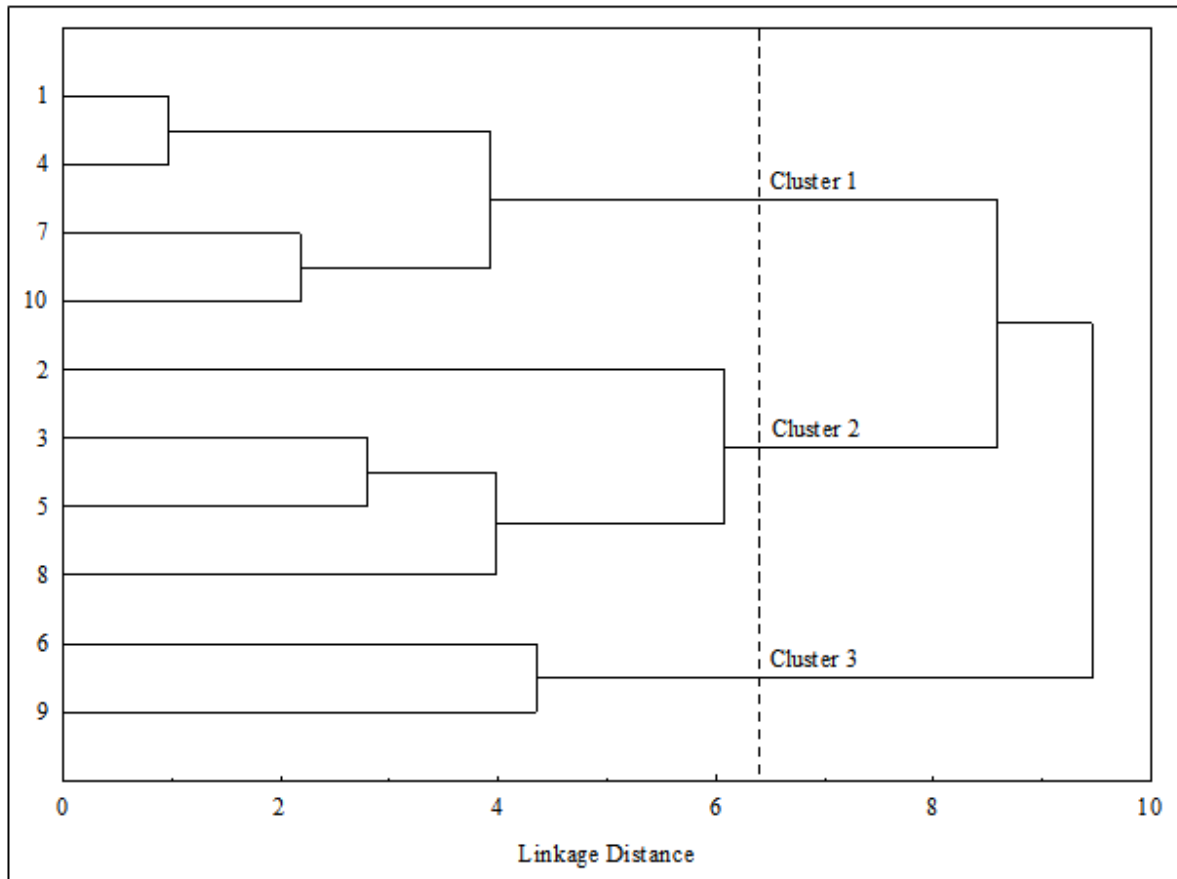


Figura 3 – Dendrograma para as cervejas obtido pela análise hierárquica de agrupamentos

Tabela 12 – Dados das cervejas agrupados por compostos fenólicos e atividade antioxidante

Análises (mg/L)	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	DPA	p(value)*	p(value)**
CFT	656,97 ^b	826,14 ^a	994,61 ^a	154,75	0,80	0,01
FT	54,06 ^b	71,04 ^{ab}	149,38 ^a	50,25	<0.001	0,03
DPPH	5,55 ^b	2,91 ^b	52,77 ^a	20,94	0,21	<0.001
ABTS	12,15	19,85	45,79	20,95	0,17	0,18
Ác. Gálico	12,19	26,74	nd	17,22	0,15	0,66
Catequina	13,76	17,42	19,73	3,47	0,46	0,09
Ác. Siríngico	nd	0,73	nd	0,41	-	
Ác. Cafeíco	nd	0,40	nd	0,50	-	
Ác. Ferrúlico	0,33 ^b	4,19 ^a	3,74 ^{ab}	2,45	0,04	
Rutina	0,24	1,06	nd	1,02	0,16	0,34
Ác. p-cumárico	nd	1,93	1,81	1,42	0,24	0,08
Ác. Trans-cinâmico	0,03	nd	0,23	0,10	0,99	0,36

DPA – Desvio padrão agrupado

*p(value) – Teste de homogeneidade de variâncias por Hartley ou Teste F

**p(value) – one way ANOVA ou Welch ANOVA

nd – valores não detectados

Letras diferentes representam que as amostras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

6 CONCLUSÕES

As amostras de cervejas artesanais, tanto as de fermentação Ale quando Lager apresentaram bons resultados no conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, demonstrando que quando consumida moderadamente, esta pode ser uma fonte de compostos bioativos, podendo trazer tantos benefícios que esta classe proporciona.

Os resultados obtidos por cromatografia líquida demonstraram que as amostras de cerveja de fermentação tipo Ale contém uma maior quantidade de compostos fenólicos, de acordo com os padrões utilizados incluindo o ácido gálico, presente apenas neste grupo de amostras.

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

Em vista dos resultados obtidos pelos testes químicos e em CLAE, é sugerido que sejam feitos estudos mais específicos quanto aos fenômenos bioquímicos fermentativos durante o processamento da cerveja, que demonstrem e expliquem as diferenças entre os compostos fenólicos isolados dos tipos de fermentação Ale e Lager,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. v.23, p.121-128, 2003.

BAMFORTH, C. W. **Beer: an ancient yet modern biotechnology**. Chem. Educator, v. 5, p. 102-112, 2002.

BARTOSZ, Grzegorz. **Chemical and Functional Properties of Foods Component Series**. Boca Raton: Taylor e Francis Group. 2013.

BEHLING, Estela Beatriz; SENDÃO, Milena Cristina; FRANCESCATO, Heloisa Della Coletta; ANTUNES; Lusânia Maria Gregg; BIANCHI, Maria de Lourdes Pires. **Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas**. Alimentos e Nutrição. v. 15, nº 3, p. 285-292, 2004.

BEZERRA, Aline Sobreira; NORBERG, José Laerte; LIMA; Fernanda Oliveira; ROSA, Marcelo Barcellos; CARVALHO, Leandro Machado. **Parâmetros climáticos e variação de compostos fenólicos em cevada**. Ciência Rural. Santa Maria, v.43, nº9, p.1546-1552, 2013.

BRASIL. **Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário oficial da República Federativa do Brasil. p. 19549, Brasília, 1997.

CARVALHO, Lilian Guerreiro. **Produção de Cerveja**. Dossiê Técnico. REDETEC- Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** Journal of Food and Drug Analysis. v. 10, p. 178-182, 2002.

CHARLES, Denys J.. **Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources.** Norway: Frontier Natural Products Co-up. 2013.

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, n° 3, p. 303-307, 2006.

GASOWSKI, B., LEONTOWICZ, M., LEONTOWICZ, H.. **The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets.** J Nutr Biochem. v.15, p. 527–533, 2004.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** Biochemical Society Transactions. v.35. p. 1147–1149, 2007.

HAMINIUK, Charles W. I.; PLATA-OVIEDO, Manuel Salvador Vicente; GUEDES, Amanda Roman; STAFUSSA, Ana Paula; BONA, Evandro; CARPES, Solange Terezinha. **Chemical, antioxidant and antibacterial study of brasilian fruits.** International Journal of Food Science & Technology. v. 46, p. 1529-1537, 2011.

HAMINIUK, Charles W. I.; MACIEL, Giselle M.; OVIEDO, Manuel S. V. Plata; PERALTA, Rosane M. **Phenolic compounds in fruits – an overview.** International Journal of Food Science & Technology. v. 47, p. 2013-2024, 2012.

MACIEL, Denis Cardoso; ELÓI, Ligia 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, n°1, p. 41-52, 2013.

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.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITAO, G.G. **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method**. Phytotherapy Research, v. 15, p. 127-130, 2001.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1ed. Gráfica Araguaia. São Paulo, 2011.

MORAIS, Selene M.; CAVALCANTI, Eveline S. B.; COSTA, Sônia Maria; AGUIAR, Lisa A.. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consume no Brasil**. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.19, p. 315-320, 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.

NARDINI, Mirella; NATELLA, Fausta; SCACCINI, Cristina; GHISELLI, Andrea. **Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans**. The Journal of Nutritional Biochemistry. v.17, p 14-22, 2006.

PINELI, Livia Lacerda de Oliveira. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos**. Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2009.

RIBEIRO, Suellen; MATOS, Gabriela; MARQUES, Manuel; LIMA, Alessandro. **Caracterização físico-química, fenólicos totais e capacidade antioxidante de uvas *Benitaka* Cultivadas no estado do Piauí-Brasil**. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. Belém, 2009.

SAHREEN, S., KHAN, M.R. & KHAN, R.A. **Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits.** Food Chemistry. v.122, 1205–1211, 2010.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. **Phenolic antioxidants.** CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Boca Raton, v.32, n^o1, p.67-103, 1992.

SILVA, Marília Lordelo Cardoso; COSTA, Renata Silva; SANTANA, Andréa dos Santos; KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais.** Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n^o 3, p. 669-682, 2010.

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.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUSA, Cleyton Marcos de M.; SILVA, Hilris Rocha e; JUNIOR, Gerardo Magela Vieira; AYRES, Mariane Cruz C.; COSTA, Charllyton Luis S. da; ARAÚJO, Delton Sérvulo; CAVALCANTE, Luis Carlos D.; BARROS, Elcio Daniel S.; ARAUJO, Paulo Breitner de M.; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Química Nova. v. 30, n^o 2, p. 351-355, 2007.

TALUFO, 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.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOPA, U.; CROSBYB, K.; ZEVALLOSC, L. C.; BYRNEC, D. H. **Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts.** Journal of Food Composition and Analysis. v. 19, p. 669-675, 2006.

WEI, A., MURA, K., & SHIBAMOTO, T. **Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 49, p.4097–4101, 2001.

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, Haifeng; CHEN, Wefen; LU, Jian; ZHAO, Mouming. **Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers.** Food Chemistry. v. 119, p.1150-1158, 2010.