



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CULTURA E ARTE**  
**CURSO DE BACHARELADO EM GASTRONOMIA**

**MURILO SÉRGIO DA SILVA JULIÃO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CERVEJAS ARTESANAIS**  
**PRODUZIDAS EM FORTALEZA E REGISTRADAS NO MINISTÉRIO DA**  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**FORTALEZA**

**2019**

MURILO SÉRGIO DA SILVA JULIÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CERVEJAS ARTESANAIS  
PRODUZIDAS EM FORTALEZA E REGISTRADAS NO MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Bacharelado em Gastronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Gastronomia.

Orientador: Prof. MSc. Leopoldo Gondim Neto.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- J89a Julião, Murilo Sérgio da Silva.  
Avaliação da atividade antioxidante em cervejas artesanais produzidas em Fortaleza registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Murilo Sérgio da Silva Julião. – 2019.  
43 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de cultura e Arte, Curso de Gastronomia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Me. Leopoldo Gondim Neto.
1. Análise de alimentos e bebidas. 2. Radicais livres. 3. Gastronomia. I. Título.

CDD 641.013

---

MURILO SÉRGIO DA SILVA JULIÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CERVEJAS ARTESANAIS  
PRODUZIDAS EM FORTALEZA E REGISTRADAS NO MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Bacharelado em Gastronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Gastronomia.

Aprovada em: 01/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. MSc. Leopoldo Gondim Neto (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. MSc. Renato Rodrigues Brasil  
Centro Universitário Unichristus (UNICHRISTUS)

Às mulheres da minha vida: minha amada filha  
Ceci e minha amada amante Lúcia Betânia.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Leopoldo Gondim Neto, pelas conversas sempre descontraídas e pela orientação na esfera gastronômica.

Aos professores participantes da banca examinadora Paulo Henrique Machado de Sousa e Renato Rodrigues Brasil pelo tempo dispendido para a leitura deste trabalho, pelas valiosas colaborações e sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos professores do Curso de Gastronomia: Adriana Pontes, Alessandra Carneiro, Ana Erbênia, Beatriz Brandão, Davi Lima, Diana Carvalho, Eveline Alencar, Fábio de Lucca, José Arimatea, Hermano Campos, Matusaíla Macêdo, Rafael Queiroz, Robson Mota, Rodrigo Viriato e Sandro Gouveia pela valiosa contribuição em minha formação humanística e profissional.

A todos os colegas do Curso de Gastronomia que convivi durante minha permanência na academia e em especial: Ailca Pereira, Dênis Cosmo, Fernanda, Francisco Carlos, Giovana Barros, Isabel Brasil, Julianne Almeida, Líbia Amaral, Louis Anne, Mariana, Mykaela, Regiane Rabelo e Sandro pelas discussões e conversas para desestressar.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), pelo apoio financeiro e disponibilidade dos equipamentos necessários à execução e finalização deste trabalho.

*“A little beer is a plate for a king.”*

**(William Shakespeare)**

## RESUMO

O consumo de cervejas artesanais ou puro malte segue uma rota crescente entre os habitantes e visitantes de Fortaleza-CE, haja vista que cerca de 40 rótulos dessa categoria de cervejas já estão sendo comercializados nessa cidade. Deve-se considerar que esse aumento pode estar relacionado também a aspectos sensoriais e nutricionais dessa bebida, pois cervejas de um modo geral contêm quantidades apreciáveis de compostos fenólicos, que protegem contra várias doenças, atuam como antioxidantes naturais e absorvedores de radicais livres em sistemas fisiológicos. Assim, devido ao importante papel desempenhado pelos antioxidantes fenólicos na produção das propriedades salutares das cervejas é indispensável se dispor de métodos capazes de mensurar a atividade antioxidante (AA). Entre os métodos tradicionais para mensurar a AA estão os do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>), do ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) e o do reagente de Folin-Ciocalteu. O alvo deste trabalho foi determinar a AA em três tipos de cervejas artesanais (D&G, HS e W5B) fabricadas por uma microcervejaria de Fortaleza-CE e três cervejas (P, S e I) fabricadas em escala industrial, a fim de correlacionar com os respectivos teores de fenóis totais (TFT). Os resultados indicam que as cervejas artesanais D&G, HS e W5B apresentaram maiores TFT:  $149,82 \pm 0,36$ ;  $141,50 \pm 0,40$  e  $124,85 \pm 0,46$ , respectivamente, do que as cervejas P, S e I:  $80,86 \pm 1,20$ ;  $53,51 \pm 2,78$  e  $27,35 \pm 2,60$ , respectivamente. Estes resultados podem ter relação direta com o teor de polifenóis do cereal maltado e do lúpulo utilizado. O método do DPPH<sup>•</sup> mostrou-se controverso, pois as cervejas produzidas em larga escala (S e I), que geralmente contêm menos de 40% de malte, apresentaram maiores valores de AA do que as cervejas artesanais (HS, D&G e W5B) e puro malte (P). Pelo método do ABTS, a ordem decrescente de AA para as cervejas artesanais HS, D&G e W5B foi:  $82,99 \pm 0,51 > 79,61 \pm 0,36 > 48,77 \pm 0,41$ , respectivamente. As cervejas produzidas em larga escala P, I e S, apresentaram os seguintes valores de AA:  $72,71 \pm 1,20$ ;  $52,87 \pm 2,60$  e  $47,56 \pm 2,78$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** Análise de alimentos e bebidas. Gastronomia. Radicais livres.



## ABSTRACT

The consumption of craft or pure malt beers follows a growing route between the inhabitants and visitors of Fortaleza-CE, considering that about 40 labels of this category of beers are already being marketed in that city. It should be considered that this increase may also be related to sensory and nutritional aspects of this beverage, because beers generally contain appreciable amounts of phenolic compounds, which protect against various diseases, act as natural antioxidants and absorbers of free radicals in physiological systems. Thus, due to the important role played by phenolic antioxidants in the production of salutary properties of beers, it is indispensable to have methods capable of measuring antioxidant activity (AA). Among the traditional methods for measuring AA are 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and the Folin-Ciocalteu reagent. The aim of this work was to determine the AA in three types of craft beers (D&G, HS and W5B) manufactured by a microbrewery of Fortaleza-CE and three beers (P, S and I) manufactured on an industrial scale in order to correlate with their total phenols (TFT). The results indicate that the craft beers D&G, HS and W5B presented higher TFT:  $149.82 \pm 0.36$ ;  $141.50 \pm 0.40$  and  $124.85 \pm 0.46$ , respectively, than beers P, S and I:  $80.86 \pm 1.20$ ;  $53.51 \pm 2.78$  and  $27.35 \pm 2.60$ , respectively. These results may be directly related to the polyphenol content of the malted cereal and hops used. The DPPH<sup>•</sup> method was controversial, since large-scale beers (S and I), which generally contain less than 40% malt, had higher AA values than craft beers (HS, D&G and W5B) and pure malt (P). According to the ABTS method, the decreasing order of AA for HS, D&G and W5B craft beers was:  $82.99 \pm 0.51 > 79.61 \pm 0.36 > 48.77 \pm 0.41$ , respectively. Large-scale beers, P, I and S, had the following AA values:  $72.71 \pm 1.20$ ;  $52.87 \pm 2.60$  and  $47.56 \pm 2.78$ , respectively.

**Keywords:** Food and beverage analysis. Gastronomy. Free radicals.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante (A–H) através da transferência de um átomo de hidrogênio .....	23
Figura 2 – Geração do radical catiônico ABTS <sup>•+</sup> a partir da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio .....	24
Figura 3 – Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu .....	25
Figura 4 – Banho de ultrassom Bransonic CPX2800 <sup>®</sup> (Branson) .....	26
Figura 5 – pHmetro Accumet <sup>®</sup> AB150 e eletrodo de vidro indicador (Fischer Scientific) ....	26
Figura 6 – Espectrofotômetro UV-Visível Genesys <sup>®</sup> 10S (Thermo Scientific) .....	26
Figura 7 – Aspecto visual do ensaio para a quantificação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	27
Figura 8 – Análise dos componentes principais (PCA) .....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão do ácido gálico (AG) .....	28
Gráfico 2 – Curva padrão do Trolox .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de fenóis totais (TFT) nas amostras de cervejas determinado pelo método de F-C .....	31
Tabela 2 – Atividade antioxidante (%AA) nas amostras de cervejas determinada pelo método do DPPH <sup>•</sup> .....	32
Tabela 3 – Atividade antioxidante (%AA) nas amostras de cervejas determinada pelo método do ABTS .....	33
Tabela 4 – Comparação entre os valores médios das AA de cervejas artesanais e industrializadas determinadas pelos métodos do DPPH <sup>•</sup> , ABTS e F-C .....	34
Tabela 5 – Teste de Tukey para os métodos do DPPH <sup>•</sup> , ABTS e F-C .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
(%)AA	Porcentagem de Atividade Antioxidante
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	Ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACervAs	Associação de Cervejeiros Artesanais
CervBrasil	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
DNA	Ácido Desóxiribonucléico
DPPH•	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
EBC	European Brewing Convention (Convenção dos Cervejeiros Europeus)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
F-C	Folin-Ciocalteu
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCA	Análise de Componentes Principais
TFT	Teor de Fenóis Totais

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
2.1	Cervejas .....	16
2.1.1	Cervejas Produzidas em Escala Industrial .....	16
2.1.2	Cervejas Produzidas em Escala Artesanal .....	18
2.1.3	Cervejas Artesanais Produzidas em Microcervejarias de Fortaleza-CE .....	19
2.2	Antioxidantes .....	19
2.3	Cerveja e Saúde .....	21
2.4	Métodos de Determinação de Atividade Antioxidante .....	22
2.4.1	Método de Determinação de Atividade Antioxidante pelo Radical DPPH <sup>•</sup> .....	23
2.4.2	Método de Determinação de Atividade Antioxidante pelo Radical ABTS <sup>•+</sup> .....	24
2.4.3	Método de Determinação do Teor de Fenóis Totais pelo Reagente de Folin-Ciocalteu ....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
4.1	Reagentes .....	26
4.2	Equipamentos .....	26
4.3	Amostras de Cervejas Produzidas em Escalas Artesanal e Industrial .....	27
4.4	Determinação Espectrofotométrica do Teor de Fenóis Totais .....	27
4.5	Determinação Espectrofotométrica da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH <sup>•</sup> ..	28
4.6	Determinação Espectrofotométrica da Atividade Antioxidante pelo Método do ABTS ....	29
4.7	Análise Estatística dos Resultados de Atividade Antioxidante e Teor de Fenóis Totais ....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
5.1	Determinação do Teor de Fenóis Totais (TFT) .....	31
5.2	Determinação da (%AA ou Capacidade Sequestrante do Radical DPPH <sup>•</sup> .....	32
5.3	Determinação da (%AA ou Capacidade Sequestrante do Radical ABTS <sup>•+</sup> .....	33
5.4	Comparação entre os valores de (%AA e TFT obtidos pelos Métodos do DPPH <sup>•</sup> , ABTS e Folin-Ciocalteu .....	34
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o artigo 36 do decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994; cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. No parágrafo primeiro do mesmo decreto, está escrito que parte do malte de cevada e o lúpulo poderão ser substituídos por adjuntos cervejeiros, cujo emprego é limitado a uma quantidade máxima. Podem ser considerados adjuntos cervejeiros a cevada e os demais cereais aptos para o consumo humano, maltados ou não-maltados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal (BRASIL, 2009).

O Anuário 2016 da CervBrasil (2016) destaca que apesar do Brasil ser o terceiro maior produtor mundial de cervejas, o consumo *per capita* desta bebida ainda é pequeno, pois ocupa apenas a 27ª posição entre os maiores consumidores. Entretanto, o setor cervejeiro no Brasil é promissor, pois vem crescendo ano após ano. E há uma categoria de cervejas que tem atraído os consumidores mais exigentes: as cervejas artesanais ou puro malte. Em 2012, as cervejas especiais representavam 8% do mercado nacional da bebida e encerraram 2014 com uma participação de 11% e cerca de 300 microcervejarias funcionando no país. A projeção é de que essa cota suba para 20% em 2020 (LIMA, 2019).

A Cervejaria Nordeste produtora da cerveja *Drache Bier* começou a operar, no município de Horizonte, em fevereiro de 2010, portanto pioneira no Ceará e também uma das primeiras microcervejarias das regiões Norte/Nordeste (O POVO, 2012). Atualmente a 5Elementos Cervejaria Artesanal, fundada em 2016, produz os principais rótulos de cervejas artesanais que abastecem Fortaleza. Dentre estes, dois já foram premiados pelo mais importante concurso de cerveja caseira do País: o Concurso Nacional das ACervAs. Os rótulos Wit 5 Bier e Abyssal venceram as categorias *witbier* e *imperial stout*, respectivamente, conquistando medalha de ouro na 11ª edição do concurso, realizado no Rio de Janeiro (CERVEJARIA ARTESANAL 5ELEMENTOS, 2019).

Além dos aspectos socioculturais relacionados ao consumo da cerveja, esta bebida possui funções nutricionais já reconhecidas. Por exemplo, os polifenóis encontrados na cerveja, similares aos do vinho, protegem contra as doenças cardiovasculares e o câncer (BOBAK; SKODOVA; MARMOT, 2000; DUTHIE; DUTHIE; KYLE, 2000; GHISELLI et al., 2000; GERHÄUSER, 2005; ONÑATE-JAÉN; BELLIDO-MILLA; HERNÁNDEZ, 2006; FEGREDO et al., 2009).

Os compostos fenólicos, apesar de atuarem principalmente na melhoria de características sensoriais como: cor e sabor também são excelentes doadores de elétrons, agindo como espécies antioxidantes nos alimentos e como absorvedores de radicais livres em sistemas fisiológicos (SOUSA et al., 2007; JANDERA, 2009).

Assim, devido às propriedades salutareas das cervejas; nas quais os antioxidantes fenólicos desempenham importante papel e considerando-se que suas propriedades nutracêuticas continuam sendo alvo de estudos; é indispensável se dispor de métodos capazes de medir a atividade antioxidante (SHARMA et al., 2005; ONÑATE-JAÉN; BELLIDOMILLA; HERNÁNDEZ, 2006; FEGREDO et al., 2009; GÜLÇIN, 2012). Entre os métodos tradicionais de avaliação da atividade antioxidante, estão o do ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e o do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), que são fáceis de executar e apresentam baixo custo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; RE et al., 1999). Para a determinação do teor de fenóis totais (TFT), o método mais indicado é do reagente de Folin-Ciocalteu (F-C) (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Esses ensaios são baseados na descoloração da solução por meio do mecanismo de transferência eletrônica e de átomos de hidrogênio dos antioxidantes.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi investigar e correlacionar os perfis fenólicos com as atividades antioxidantes de cervejas artesanais produzidas por uma microcervejaria de Fortaleza, Ceará, Brasil e registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Cervejas

#### 2.1.1 Cervejas Produzidas em Escala Industrial

Cerveja é um tipo de bebida amplamente consumida em todo o mundo, sendo a terceira bebida mais consumida e a primeira entre as bebidas alcoólicas (NELSON, 2005; WUNDERLICH; BACK, 2009). É uma bebida natural popular sem gordura que contém ácidos orgânicos, vitaminas do malte, proteínas, lúpulo e água. Comparada a outras bebidas alcoólicas, a cerveja tem um maior valor nutricional devido à presença de vários minerais e nutrientes essenciais como potássio, magnésio, cálcio, fósforo e uma pequena quantidade de sódio (BAMFORTH, 2002; TAFULO et al., 2010). Também é fonte de vitaminas do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP e B<sub>12</sub>) originadas a partir do malte e levedura. A utilização de cereais e malte na produção de cerveja também contribui para a ingestão de antioxidantes naturais, como: compostos fenólicos, produtos da reação de Maillard e sulfitos (TAFULO et al., 2010; ZHAO; ZHAO, 2012).

Existe uma variedade muito grande de cervejas e por isto estas podem ser categorizadas de acordo com (i) o processo de fabricação: altas ou baixas temperaturas de fermentação (fermentação superior e inferior, respectivamente); (ii) a cor (escura ou clara); (iii) o teor de álcool (suave ou forte); (iv) os tipos de aditivos adicionados; v) o conteúdo do extrato ou (vi) a origem (WUNDERLICH; BACK, 2009). A cor do malte da cerveja é expressa em unidades da Convenção dos Cervejeiros Europeus (European Brewing Convention, EBC).

Por causa dos diferentes componentes químicos, sabor e das tecnologias de produção, diferentes tipos e variações de cervejas podem ser discriminadas dentro de uma categoria específica de cerveja. Por exemplo, as cervejas mais populares de alta fermentação são as de trigo e *ale*, enquanto que a maioria das cervejas resulta da baixa temperatura de fermentação, ou seja, a *lager*, *pilsner*, *bock* e porte Báltico (ESLINGER, 2009). Em comparação com a *pilsner*, a *lager* apresenta maior teor alcoólico e menor amargor. Malte de cevada, lúpulo, água e fermento são usados no processo de fermentação da *pilsner*, enquanto que na produção da *lager*, além desses ingredientes, são adicionados ainda malte de trigo, milho e açúcar.

Vale ressaltar que um grande número de cervejas pertencente a ambas variedades (*pilsner* e *lager*) pode ser agrupado segundo a cor, o tipo de aditivo e propriedades aromático-gustativas (PAVSLER; BUIATTI, 2009a; PAVSLER; BUIATTI, 2009b). As *pilsner* apresentam um teor de extrato de 11 a 13,9%, teor alcoólico de 4 a 5,5% e intensidade da cor no intervalo de 4 a 8 unidades EBC. Ao contrário, as cervejas *lager* apresentam maior teor de extrato (11 a 16%), teor alcoólico (4 a 6%) e a intensidade da cor varia de 4 a 8 unidades EBC para *lagers* claras ou de 35 a 60 unidades EBC para *lagers* escuras (PAVSLER; BUIATTI, 2009a; PAVSLER; BUIATTI, 2009b; WUNDERLICH; BACK, 2009).

As cervejas do tipo *lager* são as mais consumidas em todo o mundo e são produzidas com cepas de *Saccharomyces calshbergensis*, sendo fermentadas à temperaturas de 3,3 a 13,0°C por 4 até 12 semanas. Por outro lado, as cervejas tipo *ale* são geralmente fermentadas a temperaturas mais altas (cerca de  $20 \pm 4^\circ\text{C}$ ) por períodos mais curtos com cepas de maior qualidade de *Saccharomyces cerevisiae*, esse tipo de cerveja é o mais consumido na Alemanha, Bélgica, Canadá, Estados Unidos e Grã-Bretanha (ARAÚJO et al., 2003; PAVSLER; BUIATTI, 2009a; PAVSLER; BUIATTI, 2009b; WUNDERLICH; BACK, 2009; CERVESIA, 2018; SINDICERV, 2018).

O porte Báltico é um tipo de cerveja escura, quase preta (> 60 unidades EBC) enquanto que a *bock* é âmbar (40-60 unidades EBC). Estes tipos de cervejas apresentam maiores teores de álcool e de extrato do que a *lager* e a *pilsner*. Especificamente, para as cervejas de porte Báltico, os teores de extrato e de álcool situam-se entre 18-22% e 8-9,5%, respectivamente, enquanto que as cervejas *bock* apresentam teores de extrato e alcoólico de 16 a 18% e de 6 a 8%, respectivamente. Além disso, frutas, caramelo, chocolate, nozes, café, melão e outros aditivos também são usados no processo de produção da cerveja tipo porte Báltico (ESLINGER, 2009; PAVSLER; BUIATTI, 2009a; PAVSLER; BUIATTI, 2009b; WUNDERLICH; BACK, 2009).

Como mencionado anteriormente, as cervejas de trigo e *ale* resultam da alta fermentação. As cervejas de trigo contêm pelo menos 50% de malte de trigo, o conteúdo do extrato pode variar de 11,8% a 14% e a porcentagem de álcool se situa entre 4,3% a 5,6%. As cervejas tipo *ale* são produzidas a partir de uma mistura de maltes comuns e de caramelo, seus teores de extrato e a porcentagem de álcool variam na mesma faixa das cervejas de trigo. Ambos os tipos de cervejas de alta fermentação podem ser claras (5-18 unidades EBC) ou escuras (35-60 unidades EBC) (ESLINGER, 2009; PAVSLER; BUIATTI, 2009a; PAVSLER; BUIATTI, 2009b; WUNDERLICH; BACK, 2009).

### 2.1.2 Cervejas Produzidas em Escala Artesanal

O termo “cerveja artesanal” (ou “segmento de cervejas artesanais”) é uma expressão merecedora de uma definição mais precisa, e Acitelli (2013) em seu livro sobre a história da cerveja artesanal, assim define a cervejaria que produz essa bebida em escala artesanal:

Tipo de cervejaria que inclui qualquer pequena cervejaria de propriedade independente que adere aos ingredientes e práticas tradicionais de fabricação de cerveja. As cervejarias artesanais são diferentes das grandes cervejarias regionais e nacionais, que frequentemente usam ingredientes não tradicionais e fermentam numa escala muito maior (ACITELLI, 2013).

Esta definição incorpora as duas variáveis que distinguem ou definem a cerveja artesanal: o tipo de cerveja e o tamanho da instalação que a produz (embora ambas as medidas, "tipo" e "tamanho" sejam elásticas). Pelo tipo de cerveja, a cerveja artesanal pode significar diferentes variedades de cerveja; *ale*, *stout*, *porter*, até as *lager*, mas nunca deverá ser fabricada com aditivos ou ingredientes artificiais. A Associação Americana de Cervejeiros Artesanais (BREWERS ASSOCIATION, 2014) considera uma cervejaria artesanal como:

Pequena, independente e tradicional. Pequena significa fabricar menos de 6 milhões de barris por ano. Independente significa que menos de 25% da cervejaria pertence a um fabricante de cerveja não artesanal. Tradicional refere-se a um foco em cervejas produzidas inteiramente ou principalmente de malte e não diluídas com adjuntos como milho ou arroz (BREWERS ASSOCIATION, 2014).

Para a maioria dos consumidores, a cerveja artesanal está associada à pequena escala de produção da cervejaria: microcervejarias e bares que produzem suas cervejas. A fermentação caseira é exemplo típico da produção em pequena escala e integração vertical.

Ao longo da última década (2008-2018), a indústria cervejeira artesanal tem experimentado um rápido crescimento em vários países e em muitos casos as microcervejarias são a força motriz (McLAUGHLIN; REID; MOORE, 2014; REID; McLAUGHLIN; MOORE, 2014; CANNATELLI, B.; PEDRINI, M.; GRUMO, 2015; FASTIGI et al., 2015; BREWERS ASSOCIATION, 2016).

No Brasil, a produção artesanal de cervejas teve um aumento significativo no final do século XX, pois naquele momento deu-se início uma intensificação do consumismo por parte dos brasileiros por conta da abertura comercial iniciada em 1992 (FERREIRA et al., 2011). Pode-se considerar que nessa época o paladar dos consumidores de cervejas no Brasil passou também a saborear novas marcas de cervejas nacionais e/ou importadas (STEFENON, 2012). Essa mudança no comportamento consumista pode estar relacionada ao aumento da demanda por produtos de qualidade superior e de maior sofisticação, como os vinhos finos, os cafés *gourmet* e, mais recentemente, as cervejas artesanais.

### ***2.1.3 Cervejas Artesanais Produzidas em Microcervejarias de Fortaleza-CE***

As diversas marcas de cervejas industrializadas são bastante consumidas e já estão consolidadas no país, porém os consumidores atualmente apregoam um novo lema “beber menos, porém melhor” e focando esta nova situação é que as cervejarias artesanais ganham força no cenário atual brasileiro. No Nordeste brasileiro, esse movimento ainda é muito recente, pois há cerca de uma década não havia nenhuma cervejaria que produzisse uma boa cerveja artesanal nessa região.

Hoje em dia, as microcervejarias artesanais tomaram conta da região metropolitana de Fortaleza, onde foram feitos investimentos em bares especializados em cervejas artesanais e nas microcervejarias inauguradas nos últimos cinco anos: 5Elementos, Turatti, Bold Brewing e Schaide Bier, que vendem suas cervejas especiais para um público sedento dessa bebida. Este fenômeno pode ser atribuído a uma demanda dos consumidores mais exigentes.

Uma das consequências desse movimento foi o ganho que o setor gastronômico está obtendo, pois essa bebida milenar passou a ser apreciada, assim como vinho, em harmonizações e preparação de pratos, rompendo um paradigma afirmado por muitos de que apenas o vinho é uma bebida “refinada”, uma vez que, com a ampla variedade de cervejas artesanais disponível torna-se mais fácil utilizá-la no acompanhamento de pratos de nossa culinária.

## **2.2 Antioxidantes**

Espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas ( $OH^\bullet$ ) são produzidas em organismos e também podem ser induzidas por fontes exógenas, como: fumaça de cigarros, radiação ionizante, certos poluentes, solventes orgânicos e pesticidas (HALLIWELL et al., 1995). As EROs podem atacar macromoléculas biológicas e provocar lesões em tecidos e inúmeras doenças originadas por estresse oxidativo. Pesquisas creditam aos antioxidantes um papel importante na prevenção de doenças provocadas pelas EROs no organismo humano (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

O organismo humano produz naturalmente três enzimas, chamadas antioxidantes endógenos, para catalisarem o mecanismo reacional de defesa contra as EROs. Essas enzimas formam o chamado sistema de defesa antioxidante, sendo formado pela catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; GANDRA et al., 2004).

Além dessas substâncias, há outras que atuam como antioxidantes endógenas porém, sem ação enzimática: glutathiona, peptídeos de histidina, transferrina e ferritina, ácido dihidrolipóico e o ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>). Contudo, destaque deve ser dado aos antioxidantes exógenos:  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos. (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; HALLIWELL et al., 1995; PIETTA, 2000). Estes antioxidantes apresentam baixo peso molecular e se incorporam ao organismo mediante a dieta alimentar diária, anulando as EROs (CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007).

Os compostos fenólicos podem ser encontrados em sua forma livre ou, mais frequentemente, ligados a outros compostos, como ésteres e glicosídeos. Polifenóis derivados dos ácidos hidrobenczoicos (ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido siríngico) e hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido caféico) são extraídos principalmente no malte, enquanto que flavonóis (quercetina, canferol), chalconas (xanthohumol) e flavanonas (isoxanthohumol e prenilnaringenina) são encontrados no lúpulo. As catequinas, procianidinas e taninos derivados de flavonóis também são encontrados no malte e lúpulo. A composição final dos compostos fenólicos numa cerveja depende da qualidade da matéria-prima utilizada (cevada e lúpulo) e do processo de fermentação. (GARCÍA; GRANDE; GÁNDARA, 2004).

É sabido que os antioxidantes obtidos na dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra a oxidação celular e, portanto, têm um papel crucial na manutenção da saúde. Gey (1986) formulou a “hipótese antioxidante”, a qual afirmava que o efeito na redução do estresse oxidativo estaria relacionado à elevada quantidade de moléculas antioxidantes presentes nos alimentos. Assim, pode-se especular que os benefícios à saúde estão parcialmente associados à ingestão de frutas, hortaliças e também bebidas contendo compostos fenólicos naturais, uma vez que estes contêm antioxidantes naturais (SHILS; OLSON; SHIKE, 1994). Logo, o consumo de alimentos ou suplementos dietéticos contendo antioxidantes está relacionado à ação contra as EROs, evitando assim consequentemente vários distúrbios fisiológicos em organismos vivos.

O uso de cereais e malte na produção de cervejas contribui para a ingestão de antioxidantes naturais, como polifenóis. Portanto, um possível benefício do consumo de cerveja, ainda não totalmente estudado, está relacionado às propriedades antioxidantes (GHISELLI et al., 2000; GIROTTI et al., 2002; WEI; MURA; SHIBAMOTO, 2001). Antioxidantes naturais são "quaisquer substâncias que; quando presentes em baixas concentrações comparadas às de um substrato oxidável; retarda ou impede significativamente

a oxidação desse substrato” (HALLIWELL, 2007). Os antioxidantes naturais atuam de várias maneiras, incluindo a complexação de íons de metal no ciclo redox-catalítico, eliminação de radicais livres e decomposição de peróxidos. A intensidade destes efeitos depende da estrutura química e da concentração do antioxidante presente.

Vários autores (WOFFENDEN; AMES; CHANDRA, 2001; TAFULO, 2010; ZHAO et al., 2010; ZHAO; ZHAO, 2012) já relataram propriedades antioxidantes em diferentes amostras de cervejas. Esses trabalhos fazem das cervejas um objeto interessante para uma análise mais abrangente.

### 2.3 Cerveja e Saúde

A cerveja é considerada uma fonte de folatos e outras vitaminas do complexo B, como niacina, piridoxina e cianocobalamina, além de ser citada como importante fonte de selênio e apresentar efeito diurético, devido à alta relação potássio/sódio (BAMFORTH, 2002). 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 provocados pelo consumo de altas concentrações de etanol.

As propriedades antioxidantes dos ácidos fenólicos lhes conferem capacidade de prevenir o câncer, devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres, que causam a oxidação do DNA das células. Arimoto-Kobayashi e colaboradores (2005) ao analisaram fígado e pulmão de ratos, reportaram que componentes presentes na cerveja são capazes de proteger o organismo contra os efeitos genotóxicos de amins heterocíclicas.

Diversos compostos foram isolados a partir da cerveja e submetidos a ensaios *in vivo*, com o objetivo de estudar suas capacidades de prevenir a ocorrência de doenças cardiovasculares e degenerativas, como o câncer. Dentre os compostos isolados, destacam-se os prenilflavonoides e os alfa-ácidos. A chalcona xantohumol, juntamente com seu isômero isoxantohumol, formado durante o processamento, são os prenilflavonoides encontrados em maior concentração na cerveja. O xantohumol foi identificado como o principal agente na prevenção de câncer, devido à sua elevada capacidade antioxidante, além de apresentar propriedades anti-estrogênicas, anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, inibitória da DNA-polimerase e capacidade de controlar a proliferação de células cancerígenas (GERHÄUSER, 2005).

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo moderado de álcool é inversamente proporcional à ocorrência de doenças cardiovasculares, apresentando menor

taxa de mortalidade dentre aqueles que consomem bebidas alcoólicas moderadamente, principalmente vinho e cerveja, comparado aos indivíduos que não consomem estas bebidas ou aos que consomem em demasia (BAMFORTH, 2002). Outros estudos sugerem uma relação entre os alimentos ricos em polifenóis, como vinhos e cervejas, e a prevenção de algumas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Nos últimos anos, o interesse no estudo do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) tem aumentado devido à sua potencial atividade quimio-preventiva de câncer (GERHÄUSER, 2005). O lúpulo contém alfa-ácidos (humulonas), beta-ácidos (lupulonas) e polifenóis, como os flavonoides prenilados (GERHÄUSER, 2005; ČEH et al., 2007). Ressalte-se que o xantohumol é uma chalcona prenilada estruturalmente simples ocorrendo apenas no lúpulo. Portanto, as cervejas artesanais, feitas de lúpulo, podem ser consideradas a principal fonte dietética dos prenil-flavonoides (STEVENS; PAGE, 2004) e por isto são objeto de pesquisa e interesse.

#### **2.4 Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante (AA)**

Uma forma de avaliar as potencialidades dos antioxidantes presentes em alimentos e bebidas é por meio da determinação de suas atividades antioxidantes. A atividade antioxidante total (AA) é a quantidade de mols de um determinado radical livre capturado por um oxidante padrão, independentemente do antioxidante presente na mistura (MILLER et al., 1993). Vários ensaios analíticos têm sido usados para mensurar a AA em substâncias puras, alimentos e bebidas (OU et al., 2002).

Entre os métodos mais importantes de quantificação da AA estão: o do ácido 2,20-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS)/capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999), fenóis totais por Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927), capacidade antioxidante do ferro (III) (FRAP) (BENZIE; STRAIN, 1996; BENZIE; SZETO, 1999; PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000), capacidade antioxidante do cobre (II) (CUPRAC) (APAK et al., 2004; APAK et al., 2005; ÖZYÜREK et al., 2007) e capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) (SANCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

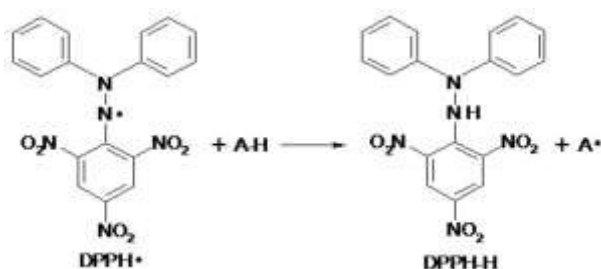
Todos esses métodos são baseados em mecanismos de transferência de elétrons (TE) ou mecanismos mistos de TE e transferência de átomos de hidrogênio (TAH), e medem a diferença de absorvância de um reagente oxidante (num comprimento de onda previamente especificado) durante o curso da oxidação de um antioxidante.

### 2.4.1 Método de Determinação da Atividade Antioxidante pelo Radical DPPH•

Embora o radical DPPH• apresente semelhanças limitadas com as EROs, o método do radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), ainda é muito usado para medir a AA de vários tipos de alimentos por meio da espectrofotometria UV-visível (LOCATELLI et al., 2009; BARTOSZEK; POLAK, 2012; MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Este método utiliza a diminuição da absorbância causada pela mudança na intensidade da cor da solução contendo o radical DPPH•, resultante da reação deste com um antioxidante, como uma medida da atividade antioxidante dos compostos (BARTOSZEK; POLAK, 2012; DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012). Entretanto, alguns estudos relatam que a diminuição no máximo de absorção no espectro UV-visível nem sempre resulta em uma diminuição da concentração do radical livre (LOCATELLI et al., 2009).

O método é baseado na transferência de elétrons do radical livre DPPH• que, por ação de um antioxidante ou outro radical, reduz o DPPH• para formar a difenil-picrilhidrazina (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), figura 1.

**Figura 1:** Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante (A–H) através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Estrutura do radical livre estável DPPH•

DPPH–H (forma reduzida)

A reação de redução do DPPH• (violeta) pode ser visualizada pela mudança de cor e monitorada num espectrofotômetro pela diminuição da absorbância no comprimento de onda ( $\lambda$ ) = 517 nm. A porcentagem de descoloração que expressa a AA ou atividade sequestradora de radicais livres pode ser calculada usando-se a equação (I):

$$(\%) \text{ AA} = \left[ \frac{(A_{\text{Controle DPPH}} - (A_{\text{AMOSTRA}} - A_{\text{BRANCO}}))}{A_{\text{Controle DPPH}}} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. I})$$

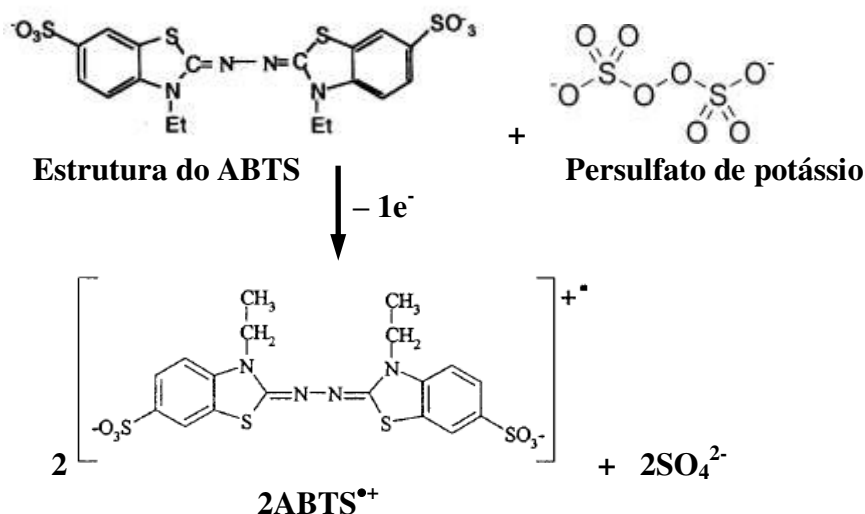
Onde: (%) AA é a atividade antioxidante em porcentagem;  $A_{\text{Controle DPPH}}$  é a absorbância do DPPH correspondente à solução inicial de DPPH, sem adição de amostra (controle),  $A_{\text{AMOSTRA}}$  é a absorbância correspondente ao DPPH que reage com os antioxidantes presentes na amostra e  $A_{\text{BRANCO}}$  é a absorbância correspondente ao branco das amostras.



### 2.4.2 Método de Determinação da Atividade Antioxidante pelo Radical ABTS<sup>•+</sup>

Esse método baseia-se na geração do radical ABTS<sup>•+</sup>, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS<sup>•+</sup> ao ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional, Figura 2 (RE et al., 1999). A determinação da (%) AA pelo método do ABTS apresenta boa estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis, além de oferecer vários máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

**Figura 2:** Geração do radical catiônico ABTS<sup>•+</sup> a partir da reação entre o ABTS e o persulfato de potássio.



Fonte: adaptado de: MILLER & RICE-EVANS, 1996.

A partir da diluição em etanol da solução padrão de Trolox (2,0 mM), dez soluções com concentrações crescentes são preparadas para a construção de um gráfico da curva padrão do Trolox. Esta curva apresenta no eixo X as concentrações das soluções diluídas e no eixo Y as respectivas absorbâncias monitoradas a  $\lambda = 734$  nm. A partir da equação da reta gerada pela curva padrão do Trolox, determina-se a absorbância referente a 1,0 mM de Trolox. A porcentagem de inibição é expressa por meio da equação (II):

$$(\%) \text{ AA} = \left[ \frac{(A_{\text{ABTS}} - A_{\text{AMOSTRA}})}{A_{\text{ABTS}}} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. II})$$

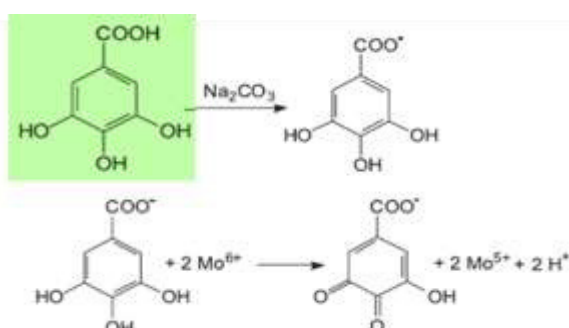
Onde: (%) AA é a porcentagem de atividade antioxidante,  $A_{\text{ABTS}}$  é a absorbância da solução com o radical formado sem a presença de antioxidante.  $A_{\text{AMOSTRA}}$  é a absorbância observada na presença do radical ABTS<sup>•+</sup> e os antioxidantes.

### 2.4.3 Método de Determinação do Teor de Fenóis Totais (TFT) pelo Reagente de Folin-Ciocalteu

O teor de fenóis pode ser determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu (F-C), este é baseado na formação de um complexo azul que pode ser analisado em  $\lambda = 765$  nm. O reagente de F-C consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, 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, são formados os complexos de molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , nos quais a média do número de oxidação dos metais está entre V e VI e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART et al., 2009).

A Figura 3 ilustra a reação do ácido gálico (AG), usado como padrão para a quantificação de fenol em diversos analitos, com o molibdênio presente no reagente de F-C.

**Figura 3:** Reação do ácido gálico com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: adaptado de: OLIVEIRA; VALENTIM; GOULART et al., 2009.

O teor de fenóis totais (TFT) de cada amostra é obtido por meio de uma curva analítica usando o ácido gálico como padrão. Cada alíquota de amostra nas concentrações de 10% (v/v) é colocada num tubo de ensaio contendo água deionizada e o reagente de F-C. Após 5 min, adicionam-se solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (m/V) e água deionizada. A mistura é mantida no escuro por 60 minutos e então mede-se a absorbância usando uma solução branco como referência.

### 3. OBJETIVOS

O alvo principal desta pesquisa foi avaliar a atividade antioxidante (AA) presente num grupo de cervejas artesanais produzidas por uma microcervejaria de Fortaleza-CE e registradas no MAPA, por meio dos métodos de determinação da AA: DPPH $\bullet$  e ABTS e do teor de fenóis totais (TFT): pelo reagente de Folin-Ciocalteu.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

- Acetona, metanol, etanol, dihidrogenofosfato de potássio, monohidrogenofosfato de sódio, persulfato de potássio e 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox).
- Agentes redutores: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) e reagente de Folin-Ciocalteu (F-C), da Sigma<sup>®</sup>.
- Padrões fenólicos: ácido gálico, quercetina e rutina, adquiridos da Sigma<sup>®</sup>.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada.

### 4.2 Equipamentos

**Figura 4:** Banho de ultrassom Bransonic CPX2800<sup>®</sup> (Branson).



Fonte: próprio autor.

**Figura 5:** pHmetro Accumet<sup>®</sup> AB150 e eletrodo de vidro indicador (Fischer Scientific).



Fonte: próprio autor.

**Figura 6:** Espectrofotômetro UV-Visível Genesys<sup>®</sup> 10S (Thermo Scientific).



Fonte: próprio autor.

### 4.3 Amostras de Cervejas Produzidas em Escalas Artesanal e Industrial

No período de novembro/2018 a março/2019 foram adquiridas em supermercados e numa microcervejaria de Fortaleza-CE, nove amostras (garrafas de 350 mL) de três marcas de cervejas artesanais registradas no MAPA: D&G, HS e W5B e nove amostras (garrafas de 350 mL) de três marcas de cervejas produzidas em escala industrial: P, I e S. A fim de não comprometer os procedimentos analíticos, as amostras foram colocadas num banho de ultrassom por 30 minutos, para a retirada do gás carbônico (CO<sub>2</sub>). O período entre a aquisição e as análises das amostras não ultrapassaram sete dias. Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-visível Genesys<sup>®</sup> 10S (Thermo Scientific) no Laboratório de Química Analítica Aplicada (LAQA) da UVA/CE.

### 4.4 Determinação Espectrofotométrica do Teor de Fenóis Totais (TFT)

O teor de fenóis totais (TFT) em cada amostra foi obtido por meio de uma curva analítica tendo o ácido gálico (AG) como padrão. Cada alíquota de 50 µL de amostra nas concentrações de 10% (v/v) foi colocada num tubo de ensaio contendo 1,0 mL de água deionizada e 250 µL do reagente de F-C. Após 5 min, foram adicionados 750 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% (m/V) e 2,95 mL de água deionizada. A mistura foi mantida no escuro por 60 minutos e então a absorbância foi medida usando uma solução em branco como referência.

A Figura 7 ilustra o aspecto visual do ensaio da determinação do teor de fenóis totais pelo método de F-C usando as concentrações de 0,0; 0,20; 0,40; 0,80 e 1,0 mg/L de AG como padrão. O gradiente de cor das soluções para obtenção da curva padrão varia de azul claro até um azul intenso.

**Figura 7.** Aspecto visual do ensaio para a quantificação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

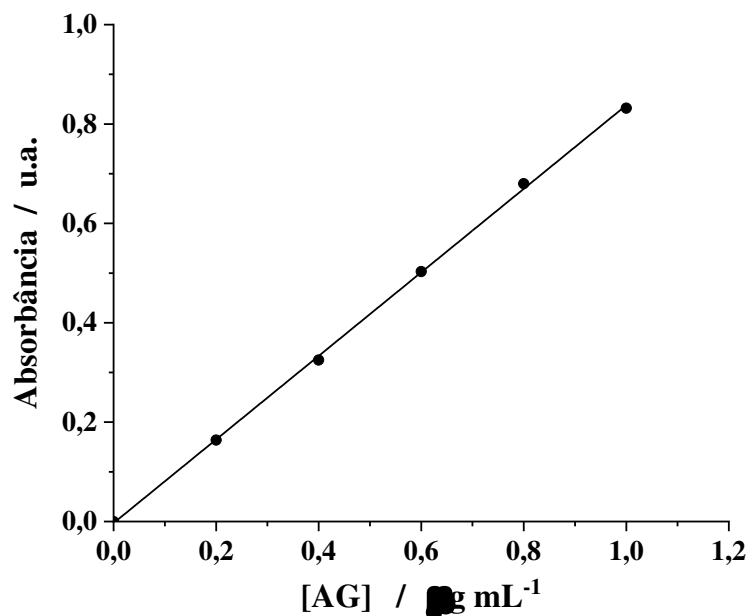


Controle 0,05 mg/L 0,10 mg/L 0,20 mg/L 0,40 mg/L 0,80mg/L 1,0 mg/L

Fonte: próprio autor

O teor de compostos fenólicos totais (TFT) foi calculado por meio da equação da reta da curva padrão de ácido gálico (AG):  $A = -0,003 (\pm 0,005) + 0,841 (\pm 0,009) [AG]$ ,  $R^2 = 0,9994$ , apresentada no gráfico 1.

**Gráfico 1:** Curva padrão do ácido gálico (AG).



A determinação do TFT nas amostras de cervejas foi realizada para uma replicata de 5 determinações e expressa em mg equivalentes de ácido gálico por litro de amostra ( $E_{AG}$  mg/L de amostra) (OLGUN et al., 2014).

#### 4.5 Determinação Espectrofotométrica da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH<sup>•</sup>

O método do DPPH<sup>•</sup> foi executado segundo o procedimento previamente estabelecido na literatura (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O branco das amostras foi produzido a partir de uma mistura de 2,70 mL da solução etanólica do DPPH<sup>•</sup> (0,10 mM) e 300  $\mu$ L de etanol. O etanol foi usado para ajustar a linha base ( $A = 0,000$ ).

A porcentagem de descoloração que expressa a AA ou atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando-se a equação (I).

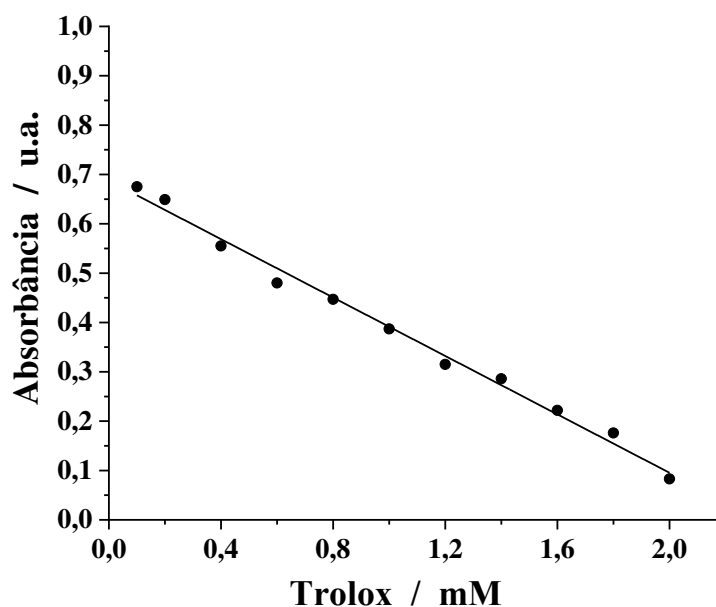
A quantificação da AA, pelo método do DPPH<sup>•</sup>, nas amostras de cervejas foi executada para uma replicata de 5 determinações e expressa em % do consumo de DPPH.

#### 4.6 Determinação Espectrofotométrica da Atividade Antioxidante pelo Método do ABTS

Neste trabalho, o método do ABTS foi adaptado do procedimento previamente estabelecido por Henriquez; Aliaga & Lissi (2002). Dessa forma, o radical  $ABTS^{•+}$  foi gerado a partir da reação de 5,0 mL de ABTS (7,0 mM) com 88  $\mu$ L de persulfato de potássio (140 mM) após armazenamento por 16 horas na ausência de luz. A seguir, 2,0 mL da solução do radical  $ABTS^{•+}$  gerado foram diluídos em etanol até 150 mL, a fim de se obter uma solução que fornecesse aproximadamente 0,700 unidades de absorvância (u.a.).

A partir da diluição em etanol de uma solução padrão de Trolox (2,0 mM), foram preparadas 10 soluções com as seguintes concentrações: 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mM para a construção da curva padrão do Trolox, gráfico 2. A partir da equação da reta:  $A = 0,687 (\pm 0,010) - 0,296 (\pm 0,009) [Trolox]$ ,  $R^2 = 0,9920$ , calcula-se a absorvância referente a 1,0 mM de Trolox.

**Gráfico 2:** Curva padrão do Trolox.



Na análise dos antioxidantes, foram adicionados 300  $\mu$ L da amostra preparada a um tubo de ensaio contendo 2,70 mL da solução do radical  $ABTS^{•+}$ . Depois disso, o tubo foi coberto com filme de Parafilm<sup>®</sup> e mantido no escuro por 20 minutos (RE et al., 1999) e as absorvâncias foram monitoradas no  $\lambda = 734$  nm. A porcentagem de inibição foi expressa por meio da equação (II). A quantificação da AA, pelo método do ABTS, nas amostras de cervejas foi realizada para uma replicata de 5 determinações e expressa em % do consumo do  $ABTS^{•+}$ .

#### **4.7 Análise Estatística dos Resultados de Atividade Antioxidante e Teor de Fenóis Totais**

Neste estudo, os resultados foram expressos como a média de 5 repetições ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão da média. . Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ) aplicando-se a análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa Origin<sup>®</sup> 8.0 (Microcal).

A matriz de Pearson foi utilizada para verificar a correlação entre os três métodos utilizados neste trabalho e a análise de componentes principais (PCA) foi realizada para melhor compreender o grupo de dados de (%AA e de TFT.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação do Teor de Fenóis Totais (TFT)

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios dos teores de compostos fenólicos totais, expressos em mg equivalente de ácido gálico por litro de cerveja.

**Tabela 1** – Teor de fenóis totais nas amostras de cervejas determinado pelo método de F-C.

Tipo de Cerveja	Amostra	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão
Artesanal	HS	141,50	0,51
	D&G	149,82	0,36
	W5B	124,85	0,46
Industrial	S	53,51	2,78
	P	80,86	1,20
	I	27,35	2,60

Como pode ser verificado, o TFT nas amostras de cervejas aumentou na seguinte ordem: I < S < P < W5B < HS < D&G, dessa forma pode-se afirmar que de fato as cervejas artesanais produzidas pela microcervejaria de Fortaleza apresentam no mínimo 2,5 e 1,5 vezes mais compostos fenólicos do que as cervejas produzidas em escala industrial e de puro malte, respectivamente. Estes resultados podem ter relação direta com o teor de polifenóis do cereal maltado e do lúpulo utilizado. De acordo com Gerhäuser (2005), cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo.

Zhao et al. (2012) relataram que o valor médio do TFT para 40 amostras de diferentes cervejas produzidas em escala industrial foi de 168,23 ± 41,74 mg de AG por litro de cerveja. Recentemente, Albanese et al. (2018) reportaram que maior valor de TFT para um grupo de quatro cervejas produzidas em laboratório foi de 122 mg de AG por litro de cerveja. Logo, é possível afirmar que as amostras de cervejas artesanais objeto de estudo deste trabalho apresentaram teores similares e/ou superiores aos obtidos por outros autores.

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).



## 5.2 Determinação da (%)AA ou Capacidade Sequestrante do Radical DPPH\*

Os valores médios da (%)AA e respectivos desvios padrão são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Atividade antioxidante (%)AA nas amostras de cervejas determinada pelo método do DPPH\*.

<b>Tipo de Produção</b>	<b>Amostra de Cerveja</b>	<b>(%)AA</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Artesanal	HS	81,24	0,13
	D&G	83,50	1,31
	W5B	69,96	0,28
Industrial	S	92,36	0,47
	P	87,06	0,70
	I	95,19	3,00

De acordo com Sousa et al. (2007) a (%)AA corresponde à quantidade de DPPH\* consumida pelo antioxidante e pode-se afirmar que, quanto maior o valor da (%)AA, maior será a atividade antioxidante da amostra analisada. Como se pode observar na Tabela 1, a cerveja I apresentou valor médio de (%)AA igual a 95,19%, enquanto a cerveja W5B (microcervejaria de Fortaleza) apresentou (%)AA = 69,95%, apresentando a menor atividade antioxidante entre as amostras analisadas. Como esta última cerveja contém, além dos ingredientes tradicionais, cascas de laranja e de limão siciliano e sementes de coentro, estes poderão ter interferido nas medidas espectrofotométricas.

Considerando-se que na produção de cervejas artesanais as microcervejarias não adicionem cereais não maltados, carboidratos, corantes, antioxidantes etc., e que a adição de maiores teores de malte esteja diretamente relacionada à maior concentração de compostos fenólicos nas cervejas artesanais, os resultados obtidos de (%)AA para as cervejas produzidas pela microcervejaria de Fortaleza e avaliadas neste trabalho: HS, D&G e W5B apresentaram valores de atividade antioxidante menores do que as cervejas produzidas em escala industrial.

Dois prováveis explicações para estes resultados: 1) compostos fenólicos não precisam necessariamente atuar como antioxidantes, e no caso das cervejas, alguns compostos encontrados como fenólicos 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 artesanais e tradicionais.

Além disso, é difícil comparar dados de literatura, devido à falta de concordância sobre o método adequado para a análise de compostos fenólicos e de AA (ZHAO et al., 2010) e 2) apesar do método do radical DPPH\* ser de fácil execução e apresentar baixo custo, este

ensaio é baseado na descoloração da solução, e em matrizes complexas, como as cervejas, existem muitos compostos que podem absorver luz na mesma faixa de comprimento de onda, causando interferência nesses dois métodos (BLASCO; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; ESCARPA, 2004; BLASCO et al., 2005; BLASCO et al., 2007; ESCARPA, 2012; OLIVEIRA-NETO et al., 2016).

### 5.3 Determinação da (%AA) ou Capacidade Sequestrante do Radical ABTS<sup>•+</sup>

Os valores médios das (%AA) e respectivos desvios padrão são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Atividade antioxidante (%AA) nas amostras de cervejas determinada pelo método do ABTS.

<b>Tipo de Produção</b>	<b>Amostra de Cerveja</b>	<b>(%)AA</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Artesanal	HS	82,99	0,51
	D&Gs	79,61	0,36
	W5B	48,77	0,46
Industrial	S	47,56	2,78
	P	72,71	1,20
	I	52,87	2,60

Quanto maior o valor da (%AA) apresentada pela amostra de cerveja, menor a quantidade do radicais livres de ABTS<sup>•+</sup>, ou seja, quanto maior o consumo de ABTS<sup>•+</sup> pela amostra, maior será sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Diferentemente dos resultados obtidos pelo método do DPPH, os valores de (%AA) obtidas pelo método do ABTS, duas das três cervejas artesanais apresentaram valores bem maiores do que as cervejas produzidas industrialmente e conforme os resultados apresentados na Tabela 3, nota-se que tanto nas cervejas artesanais como nas cervejas produzidas industriais, há uma grande variação nos resultados da AA obtidos pelo método do ABTS. Mesmo dentro do mesmo grupo de cerveja produzida, os valores de (%AA) diferiram entre si. Essas diferenças podem estar parcialmente relacionadas aos diferentes tipos de compostos fenólicos com reatividades diferentes, pois na preparação dessas cervejas está presente uma miscelânea de cereais não maltados ou carboidratos, além de antioxidantes, corantes e estabilizantes (OPA BIER, 2019).

Segundo ZHAO et al. (2010) a cerveja é um conjunto de compostos naturais com atividades e mecanismos antioxidantes presentes nela e é definida pela sua composição e pelos métodos de fabricação utilizados, logo, se diferentes métodos são utilizados para a

determinação da AA com base em diferentes mecanismos de reação, resultados diferentes serão obtidos.

Os resultados obtidos com o método do ABTS corroboram em parte os obtidos pelo método de F-C, pois a relação entre o TFT e a capacidade sequestrante de radicais livres nas cervejas parece ser bastante significativa, visto que as cervejas que apresentaram os maiores TFT são justamente as de com maiores (%) AA: D&G, HS e W5B (microcervejaria de Fortaleza) e P (puro malte).

As cervejas com valores de AA > 60% analisadas pelo método do ABTS, apresentaram baixos TFT, esse fato pode estar relacionado às formulações das cervejas produzidas em escala industrial que utilizam cerca de 60% de malte de cevada, principal ingrediente destas bebidas e os outros 40% são cereais não maltados ou carboidratos, como milho e arroz (OPA BIER, 2019). Essa composição visa um custo mais baixo para vender as bebidas por um preço mais atrativo. Já nas cervejas artesanais, os ingredientes são selecionados, mais nobres e alguns precisam ser até mesmo importados. Essas bebidas têm quatro componentes: água, malte, levedura e lúpulo. Isso quer dizer que as cervejas produzidas em escala artesanal não levam açúcares de fontes extras (OPA BIER, 2019).

#### 5.4 Comparação entre os valores de (%)AA e TFT Obtidos pelos Métodos do DPPH<sup>•</sup>, ABTS e F-C

A Tabela 4 resume os resultados obtidos para os teores de fenóis totais (TFT) e de %(AA) pelos métodos do reagente de F-C, DPPH<sup>•</sup> e ABTS, respectivamente. Observa-se que as cervejas que apresentaram os maiores valores de TFT não foram as mesmas que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes. Com exceção das cervejas S e I que mostraram resultados bastante diferentes para o DPPH<sup>•</sup> e ABTS.

**Tabela 4** – Comparação entre os valores médios das AA de cervejas artesanais e industrializadas determinadas pelos métodos do DPPH<sup>•</sup>, ABTS e F-C.

Tipo de Produção	Amostra de cerveja	(%) AA DPPH	(%) AA ABTS	TFT (mg L <sup>-1</sup> )
Escala Artesanal	D&G	83,50 ± 0,31 <sup>a</sup>	79,61 ± 0,36 <sup>a</sup>	149,82 ± 0,36 <sup>a</sup>
	HS	81,24 ± 0,13 <sup>b</sup>	82,99 ± 0,51 <sup>b</sup>	141,50 ± 0,40 <sup>b</sup>
	W5B	69,96 ± 0,28 <sup>c</sup>	48,77 ± 0,41 <sup>c</sup>	124,85 ± 0,46 <sup>c</sup>
Escala Industrial	P	87,06 ± 0,70 <sup>d</sup>	72,71 ± 1,20 <sup>d</sup>	80,86 ± 1,20 <sup>d</sup>
	S	92,36 ± 0,47 <sup>e</sup>	47,56 ± 2,78 <sup>e</sup>	53,51 ± 2,78 <sup>e</sup>
	I	95,19 ± 3,00 <sup>e</sup>	52,87 ± 2,60 <sup>e</sup>	27,35 ± 2,60 <sup>f</sup>

**Legenda:** letras iguais da mesma coluna indica diferença não estatística (p < 0,05) (n = 5).

Como pode ser observado na Tabela 4, os valores obtidos com o método do DPPH correlacionam-se negativamente com os TFT, enquanto os valores obtidos com o método do ABTS apresentam uma correlação positiva com os TFT. Realmente, quanto menor a quantidade de amostra necessária para reduzir a quantidade dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> maior será a atividade antioxidante.

O grupo das cervejas artesanais (exceto a W5B) apresentou maior poder antioxidante, em todos os ensaios, quando comparado ao grupo de amostras de cervejas industrializadas, num nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Dentro do grupo das cervejas artesanais, a ordem crescente de atividade antioxidante (%)AA pelo método do ABTS foi HS > D&G > W5B, já para o grupo das cervejas industrializadas foi P > I > S. As cervejas foram comparadas entre si dentro de cada grupo usando-se os testes de ANOVA e Tukey e não foi verificada nenhuma variação significativa ( $p < 0,050$ ) entre os três métodos (Tabela 5).

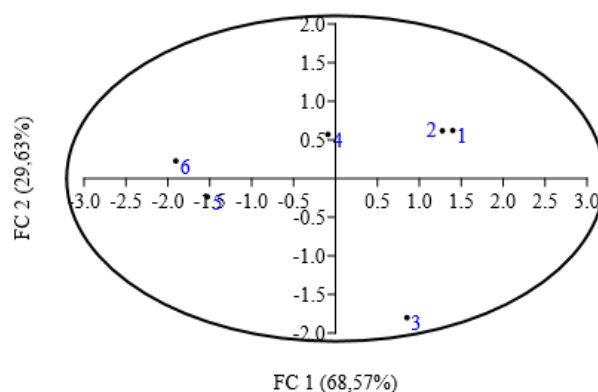
**Tabela 5** – Teste de Tukey para os métodos do DPPH<sup>•</sup>, ABTS e F-C.

Método de Determinação	DPPH <sup>•</sup>	ABTS	TFT
DPPH <sup>•</sup>	—	0,49	0,799
ABTS	1,65	—	0,200
TFT	0,908	2,56	—

De acordo com a matriz de Pearson, foi observada uma forte correlação linear entre os métodos do TFT e DPPH<sup>•</sup>; TFT e ABTS tanto para o grupo das cervejas artesanais, quanto para as industrializadas: 0,98 e 0,91; -0,85 e -0,99, respectivamente. Entretanto, os métodos do ABTS e DPPH<sup>•</sup> apresentaram uma fraca correlação para os dois grupos de cervejas (0,16 e 0,35), dando indícios de que esses métodos estão mais susceptíveis às interferências, como a turvação das amostras durante os ensaios espectrofotométricos. Este fato reitera a dificuldade de aplicação desses métodos para melhor compreender a capacidade antioxidante presente em cada amostra de cerveja (BLASCO et al., 2007; ESCARPA, 2012; OLIVEIRA-NETO et al., 2016).

Para melhor compreensão do grupo de dados, uma análise multivariada foi realizada e no gráfico da análise de componentes principais (PCA) observa-se que 98,20% da informação é explicada em dois eixos, FC1 (68,57%) e FC2 (29,63%), Figura 8. Ao longo de FC2 é possível separar dois grupos (I e II). Nos quais, a maioria dos números localizados nos quadrantes positivos pertence ao grupo I, formado principalmente pelas amostras de cervejas artesanais (HS, D&G e W5B), que apresentaram maior potencial antioxidante. Enquanto que no grupo II, duas amostras de cervejas (S e I) apresentaram pontuação negativa e outra positiva (P).

**Figura 8:** Análise dos componentes principais (PCA).



Deve-se ressaltar os altos valores encontrados de %(AA) e TFT para as amostras da cerveja P, pois apesar desta ser produzida em grande escala, a mesma é rotulada como “puro malte”, ou seja, o fabricante deve adicionar 100% de malte de cevada na sua composição. Por isto que essa cerveja apresentou resultados que correlaciona de forma positiva os três métodos de análise.

Apesar dos ensaios tradicionais usando-se radicais gerados pelo DPPH e ABTS serem fáceis de executar e apresentarem baixo custo, esses ensaios são baseados na descoloração da solução por meio do mecanismo de transferência eletrônica e de átomos de hidrogênio dos antioxidantes e numa matriz como a cerveja existem muitos compostos absorvedores de luz na mesma faixa de comprimento de onda, provocando divergências nos resultados por conta dessa interferência nos dois métodos (BLASCO; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; BLASCO et al., 2005; BLASCO et al., 2007; ESCARPA, 2012; OLIVEIRA-NETO et al., 2016).

Do mesmo modo, os resultados obtidos para a determinação do TFT pelo método de F-C são muitas vezes superestimados para matrizes complexas devido à baixa seletividade do reagente de F-C (SINGLETON et al., 1999).

Uma alternativa para diminuir essas desvantagens pode a utilização dos métodos eletroanalíticos, uma vez que estes são capazes de interpretar o comportamento redox de amostras brutas e desta forma é possível realizar suposições sobre classes de antioxidantes específicos, considerando-se que o índice eletroquímico expressa a capacidade antioxidante, introduzido pioneiramente por Escarpa e colaboradores (BLASCO; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2004; BLASCO et al., 2005; BLASCO et al., 2007; ESCARPA, 2012).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados para a atividade antioxidante, (%AA) determinada pelo método do DPPH<sup>•</sup> mostraram-se no mínimo controversos, uma vez que as cervejas produzidas em larga escala, segundo os fabricantes, contém cerca de 60% de malte, foram as que apresentaram as maiores (%AA) quando comparadas às AA das cervejas artesanais e da cerveja industrializada “puro malte”. Esses resultados dão indícios de que a aplicação dos métodos de análise utilizados neste trabalho deva ser reavaliada quando a matriz da amostra for muito complexa, pois neste caso, esses métodos podem apresentar sérias limitações.

Diferentemente dos resultados obtidos pelo método do DPPH, os valores de (%AA) obtidas pelo método do ABTS, duas das três cervejas artesanais apresentaram valores bem maiores do que as cervejas produzidas em larga escala. Entretanto há uma grande variação nos resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método do ABTS. Mesmo dentro do mesmo grupo de cerveja produzida, os valores de (%AA) diferiram entre si.

Das três marcas de cervejas artesanais avaliadas neste trabalho, apenas a W5B apresentou menor poder antioxidante, em todos os ensaios, quando comparado ao grupo de amostras de cervejas industrializadas. Dentro do grupo das cervejas artesanais, a ordem crescente de atividade antioxidante (%AA) pelo método do ABTS foi HS > D&G > W5B, já para o grupo das cervejas industrializadas foi P > I > S.

O presente trabalho mostrou que as cervejas artesanais apresentaram valores de TFT maiores do que as cervejas produzidas em larga escala, ou seja: D&G > HS > W5B (microcervejaria de Fortaleza) > P > I > S. Estes resultados podem ter relação direta com o teor de polifenóis do cereal maltado e do lúpulo utilizado.

Variações consideráveis nos resultados das (%AA) foram verificadas entre os métodos do DPPH e ABTS, principalmente nas cervejas tipo lager produzidas em larga escala. Entretanto, observa-se uma correlação positiva entre o método do ABTS e o do reagente de Folin-Ciocalteu e isto é importante, pois os compostos fenólicos parecem ser os antioxidantes mais influentes nas cervejas, uma vez que no processo de fabricação das cervejas artesanais são utilizadas maiores quantidades de malte.

## REFERÊNCIAS

- ACITELLI, T. **The Audacity of Hops: The History of America's Craft Beer Revolution**. Chicago: Chicago Review Press, 2013.
- ALBANESE, L.; CIRIMINA, R.; MENEGUZZO, F.; PAGLIARO, M. Innovative beer-brewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. **Journal of cleaner Production**, v. 171, p. 297-311, 2018.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; ÖZYÜREK, M. et al. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; ÖZYÜREK, M. et al. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. **Free Radical Research**, v. 39, n. 9, p. 949-961, 2005.
- 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.
- ARIMOTO-KOBAYASHI, S.; TAKATA, J.; NAKANDAKARI, N.; FUJIOKA, R.; OKAMOTO, K.; KONUMA, T. Inhibitory effects of heterocyclic amine-induced DNA adducts formation in mouse liver and lungs by beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 812-815, 2005.
- BAMFORTH, C. W. Nutritional aspects of beer – A review. **Nutrition Research**, v. 22, p. 227-237, 2002.
- BARTOSZEK, M.; POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2089-2093, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 633-636, 1999.
- BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 71-81, 2004.
- BLASCO, A. J.; ROGERIO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 237-244, 2005.

BLASCO, A. J.; CREVILLÉN, A. G.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. **Electroanalysis**, v. 19, p. 2275-2286, 2007.

BOBAK, M.; SKODOVA, Z.; MARMOT, M. Effect of beer drinking on risk of myocardial infarction: Population based case-control study. **British Medical Journal**, v. 20, p. 1378-1379, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREWERS ASSOCIATION. **Number of breweries**. 2016. Disponível em: <<http://www.brewersassociation.org/statistics/number-of-breweries>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

BRASIL. **Decreto Nº 6.871**, de 4 de junho de 2009. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm)>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

BREWERS ASSOCIATION. Revised craft brewer definition. **R. Beer News**, v.20, p.3, 2014.

CANNATELLI, B.; PEDRINI, M.; GRUMO, M. The effect of brand management and product quality on firm performance: the Italian craft brewing sector. **Journal of Food Products Marketing**, v. 23, n. 3, p. 303-325, 2015.

ČEH, B.; KAČ, M.; KOŠIR, I. J.; ABRAM, V. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in Hop leaves and Hop cones with regard to water supply and cultivar. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 989-1000, 2007.

CERQUEIRA, F. M.; GENNARI, M. H.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERVBRASIL. **Anuário 2016**. São Paulo: CERVBRASIL São Paulo, 2016, 64p. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf)>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

CERVEJARIA ARTESANAL 5ELEMENTOS. **5Elementos Cervejaria Artesanal**. Disponível em: <<http://5elementoscervejaria.com.br/>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

CERVESIA. **Tipos de Cerveja**. 2018. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br/tipos-de-serveja.html>>. Acesso em: 22 Mai. 2019.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, p. 1037-1043, 2012.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: Implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Review**, v. 13, p. 79-106, 2000.



ESCARPA, A. Food electroanalysis: Sense and simplicity. **The Chemical Record**, v. 12, p. 72-91, 2012.

ESLINGER, H. M. Fermentation, maturation and storage. *In*: H. M. Eslinger (Ed.), **Handbook of brewing processes, technology, markets**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, pp. 207-224.

FASTIGI, M.; ESPOSTI, R.; ORAZI, F. et al. The irresistible rise of the craft brewing sector in Italy: can we explain it? **Proceedings of the 4<sup>th</sup> AIEEA Conference: Innovation, Productivity and Growth**, Ancona, 11-12 June, p. 1-23, 2015.

FEGREDO, J. A.; MEYNELL, R.; LAI, A. K. H. et al. The antioxidant capacity of beer: Relationships between assays of antioxidant capacity, color and other alcoholic and non-alcoholic beverages. *In*: V. R. Preddy (Ed.). **Beer in health and disease prevention**. London: Elsevier Inc. 2009, p. 475-481.

FERREIRA, R. H.; VASCONCELOS, M. C. R. L.; JUDICE, V. M. M. et al. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004.

GARCÍA, A. A.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 175-180, 2004.

GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1941-1954, 2005.

GEY, K. F. On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. **Bibliotheca Nutritio et Dieta**, n. 37, p. 53-91, 1986.

GHISELLI, A.; NATELLA, F.; GUIDI, A. et al. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 76-80, 2000.

GIROTTI, S.; BOLELLI, L.; FINI, F.; BUDINI, R.; ARFELLI, G. Chemiluminescent determination of antioxidant capacity of beverages. **Italian Journal of Food Science**, v. 14, n. 2, p. 113-122, 2002.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents – An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free-radicals, antioxidants, and human-disease – where are we now. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, L.; AROUMA, O. I. The Characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, n. 7, 1995.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1149, 2007.

HENRIQUEZ, C., ALIAGA, C., LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of diferente preparation procedures. **Interantional Journal of Chemical Kinetics**, v. 34, n., p. 659-665, 2002.

JANDERA, P. Methods for HPLC analysis of phenolics compounds and flavonoids in beer. *In*: V. R. Preddy (Ed.). **Beer in health and disease prevention**. London: Elsevier Inc., p. 1003-1014, 2009.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LIMA, F. L. S. **Como montar uma microcervejaria**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ideias/Como-montar-uma-microcervejaria.pdf>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F. et al. Study of the DPPH<sup>•</sup> scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, p. 889-897, 2009.

MACIEL, D. C.; ELÓI, L. M. H. Compostos fenólicos em diferentes marcas de cerveja: comparação qualitativa de diferentes marcas e sua relação com a saúde humana. **Revista Uniara**, v.16, no 1, p. 41-52, 2013.

McLAUGHLIN, R. B.; REID, N.; MOORE, M. The ubiquity of good taste: a spatial analysis of the craft brewing industry in the United States. *In*: Patterson, M.; Hoalst-Pullen, N. (Eds.), **The Geography of Beer: Regions, Environment, and Societies**, Springer: New York, p. 131-154, 2014.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**, v. 2, n. 3, p. 161-171, 1996.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

NELSON, M. **The barbarian's beverage: A history of beer in ancient Europe**. New York: Routledge, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L. F.; SAURA-CALIXTO, J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

O POVO. **Cervejarias artesanais apostam em público refinado**. 2012. Disponível em: <<https://www20.opovo.com.br/app/opovo/economia/2012/04/21/noticiasjornaleconomia,2825291/cervejarias-artesanais-apostam-em-publico-refinado.shtml>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

OLGUN, F. A.; OZYURT, D.; BERKER, K. I. et al. Folin-Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum (III)-flavonoid complexes. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v. 94, p. 2401-2408, 2014.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA-NETO, J. R.; REZENDE, S. G.; REIS, C. F. et al. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. **Food Chemistry**, v. 190, p. 506-512, 2016.

ONÑATE-JAÉN, A.; BELLIDO-MILLA, D.; HERNÁNDEZ, A. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. **Food Chemistry**, v. 97, p. 361-369, 2006.

OPA BIER. **Cervejas Especiais Opa Bier**. 2019. Disponível em: <<https://opabier.com.br/produtos/cervejas-especiassi-opa-bier-joinville-sc/>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activity of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S. E.; BERKER, K. I. et al. Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron (III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, p. 1478-1486, 2007.

PAVSLER, A.; BUIATTI, S. Non-Lager Beer. *In*: V. R. Preddy (Ed.). **Beer in health and disease prevention**. Amsterdam: Elsevier Academic Press., 2009a, p. 17-31.

PAVSLER, A.; BUIATTI, S. Lager Beer. *In*: V. R. Preddy (Ed.). **Beer in health and disease prevention**. Amsterdam: Elsevier Academic Press., 2009b, p. 31-45.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

- PULIDO, R.; BRAVO, L. F.; SAURA-CALIXTO, J. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- REID, N., McLAUGHLIN, R. B.; MOORE, M. S. From yellow fizz to big biz: American craft beer comes of age. **Focus on Geography**, v. 57, n. 3, p. 114-125, 2014.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.
- SHARMA, V.; GULATI, A.; RAVINDRANATH, S. D. et al. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. **Journal Food Composition Analysis**, v. 18, p. 583-594, 2005.
- SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. 1951p.
- SINDICERV. **Tipos de Cerveja**. 2018. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/tipo-cerveja.php>>. Acesso em: 22 Mai. 2019.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A. et al. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p.491-498, 2008.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STEFENON, R. Vantagens Competitivas Sustentáveis na Indústria Cervejeira: O Caso das Cervejas Especiais. **Revista Capital Científico – Eletrônica**, v. 10, n.1, p. 15-30, 2012.
- STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 10, p. 1317-1330, 2004.
- TAFULO, P. A. R.; QUEIROS, R. B. C.; DELERUE-MATOS, M. et al. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. **Food Research International**, v. 43, p. 1702-1709, 2010.
- WEI, A.; MURA, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4097-4101, 2001.

WOFFENDEN, H. M.; AMES, J. M.; CHANDRA, S. Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5524-5530, 2001.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of manufacturing beer: Ingredients, process and quality criteria. *In*: V. R. Preedy (Ed.), **Beer in health and disease prevention**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2009, p. 3-17.

ZHAO, H.; CHEN, W.; LU, J. et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1150-1158, 2010.

ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of mashing on total phenolic contents and antioxidant activities of malts and worts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 240-247, 2012.