

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**FOLATOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
TRANS-2-NONENAL EM CERVEJA BRASILEIRA**

Ana Cecília Poloni Rybka

Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da
Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos**

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R96f Rybka, Ana Cecilia Poloni
Folatos, capacidade antioxidante e trans-2-nonenal em
cerveja brasileira / Ana Cecilia Poloni Rybka . --
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Cerveja. 2. Cromatografia. 3. Folatos. 4.
Antioxidantes. 5. Trans-2-nonenal I. Godoy, Helena
Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Folate, antioxidant capacity and E-2-nonenal in Brazilian beer
Palavras-chave em inglês (Keywords): Beer, Chromatography, Folates,
Antioxidants, E-2-nonenal.

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder

Juliana de Azevedo Lima Pallone

Rodrigo Ramos Catharino

Jesui Vergilio Visentainer

Data de defesa: 11/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente

Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer
Membro

Dra. Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder
Membro

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
Membro

Prof. Dra. Juliana de Azevedo Lima Pallone
Membro

Dr. Rodrigo Scherer
Membro

Prof. Dr. Roger Wagner
Membro

Profa. Dra. Elizete Maria Pesamosca Facco
Membro

“Eu recomendo... pão, carne, vegetais e cerveja.”

Sófocles na Filosofia para uma dieta moderada.

(450 aC)

Dedicatória

Dedico a minha família, que de alguma maneira contribuiu para que esta hora chegasse, mas sempre, e em especial, a meus pais, Regina e Romão, pois nada do que sou, quero ou penso existiria sem os abraços, apoio e amor que tanto recebi.

Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Sua benção não teria recebido tantas oportunidades, amigos, apoio e amor...

Agradeço também:

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos pela oportunidade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou minha dedicação total a este trabalho e à Capes pela concessão da bolsa para realização de parte da Tese em Portugal, ampliando meus horizontes e mudando meu ponto de vista.

À profa. Helena por sua orientação, amizade, alegria, disposição, compreensão, carinho, descontração, bondade, apoio e atenção.

Ao prof. Marco, por ter me recebido tão bem em Portugal e ter cedido seu tempo para me socorrer em momentos difíceis...

À Banca Examinadora, por terem aceitado participar da etapa final deste projeto, fazendo críticas e sugestões para aprimoramento do trabalho, cedendo seu tempo e atenção.

À Ju, pela ajuda nas aulas...

Ao Marcelo, pelas conversas e conselho ao longo destes muitos anos.

À Ana, jamais esquecerei a amizade e cuidado que *tu tevês* comigo, guardo o cd que *fizestes* sempre ao meu lado, assim como ao João.

Ao Pedro pela companhia natal em terras estrangeiras, divertidas histórias e passeios a base de Ginja.

À Maria pelas conversas e momentos muito divertidos.

A profa. Elvira, linda, alegre e muito amiga!

À turma do Laboratório de Análises de Alimentos, amigos e companheiros, que sempre entraram para somar, sem medo da subtração ou divisão, meu muito obrigada:

À Elizete pelos ensinamentos iniciais.

À Clau pela meiguice e paz que sempre transmitiu.

Ao queridíssimo Roger, muito amigo, com integridade e inteligência invejáveis...

Ao Scherer, também pelos ensinamentos iniciais, socorros prestados e paciência, além da picanha recheada, claro...

À Dani Pane, companheira mais antiga de desespero. Uma hora chega ao fim...

À Elede, companheira de lutas e perdas, mas o importante é que chegamos lá!

À Carol, pelos desabafos, conselhos, risadas, pães-de-queijo, cafés, maquiagem, bijus e etc...

À Merê, fôfis, querida, sempre alto astral, guerreira, exemplo.

À Dri, pelos ensinamentos de vida, brincadeiras, risadas e até lágrimas... hehe, e também por me emprestar o Augusto.

Ao Cris, pelas risadas, besteiras e prontidão a ajudar, mesmo quando ele mesmo está no aperto, obrigada.

À Dani Bio, pela ajuda aos 45 do segundo tempo. E por ter me mostrado o Santoro, claro.

À Vivi, também pelo socorro aos 45 do segundo tempo, me passando seu conhecimento de prontidão, e repetindo várias e várias vezes, o meu muito obrigada.

Ao Stanis, nunca mais tive mau olhado depois do banho de pimenta... hehehe

À Quel, grande amiga de anos, que muito me ajudou nos momentos profissionais europeus... hehe, e também nos momentos pessoais..

À Romina, pelas divertidas conversas.

À Lucíula e todo o pessoal do laboratório do piso superior, pela força.

À Gi, pela amizade e ajuda profissional.

À Cris, pelos socorros prestados e conselhos dados.

Ao “Seu” Dirceu, pessoa única, honesta, exemplar, batalhadora, boa. Sem você estaríamos em sérios apuros.

E por fim, agradeço especial e profundamente:

À família toda, **Vó Maria, Vô Clemente, Flávia, Kátia, Nádia, Nadir, Rui, Baba, Dido, Leo, Marina, Márcia e Jorge**, por todo amor e carinho.

À **Tata** por ser uma pessoa íntegra, ativa e sempre disposta a ajudar.

Ao **Amorim**, pelas ajudas até mesmo no caminhar da pós.

Ao **Fê**, meu pimpolho que cresceu e tornou-se um grande homem, correto até demais.

À **Ana**, gracias por el apoyo a toda mi familia, y cuidar de aquellos que amo.

Ao **Rogério**, pelos momentos de alegria e descontração, pelo apoio e entendimento de minha dedicação, ausência e estudo. Pela fé que você coloca em mim...

À mãe, amada, amiga, companheira, irmã, maluca, alegre, guerreira, suporte, **Regina**.

Ao pai, lindo, querido, amado, conselheiro, suporte, GPS, enciclopédia, **Romão**, que teve que ir prestar seu auxílio em outros locais, por já ter cumprido toda sua missão por aqui.

Ana Cecília Poloni Rybka

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	XVII
GENERAL ABSTRACT.....	XIX
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO 1	
CERVEJAS - COMPOSTOS FUNCIONAIS E DE CONTROLE DE QUALIDADE - UMA REVISÃO	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. CERVEJA	15
1.1. HISTÓRICO	15
1.2. DESCRIÇÃO	16
1.3. TIPOS DE CERVEJA	18
1.4. MERCADO	20
1.5. ÁLCOOL.....	21
2. FOLATOS.....	22
2.1. DESCRIÇÃO	22
2.2. BIOSÍNTESE	23
2.3. IMPORTÂNCIA.....	25
2.4. FONTES.....	28
2.5. BIODISPONIBILIDADE	29
3. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES.....	30
3.1. IMPORTÂNCIA.....	30
3.2. CLASSES	32
3.3. PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES NATURAIS EM ALIMENTOS.....	33
3.4. FONTES.....	34
4. QUALIDADE DA CERVEJA.....	35
4.1. SABOR ENVELHECIDO X TRANS-2-NONENAL	36
4.2. VIAS DE PRODUÇÃO DO TRANS-2-NONENAL	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO 2	
VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETECÇÃO DE FOLATOS LIVRES EM CERVEJAS	57
RESUMO.....	59
ABSTRACT	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAIS E MÉTODO.....	62

2.1. MATERIAL.....	62
2.2. EQUIPAMENTO E METODOLOGIA	63
2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1. SEPARAÇÃO DOS FOLATOS	66
3.2. CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	68
3.3. LIMITES	68
3.4. PRECISÃO	68
3.5. EXATIDÃO.....	75
4. CONCLUSÕES.....	75
5. AGRADECIMENTOS.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CAPÍTULO 3	
TEOR DE FOLATOS LIVRES DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE CERVEJAS	
.....	81
RESUMO.....	83
ABSTRACT	84
1. INTRODUÇÃO.....	85
2. MATERIAL E MÉTODO	86
2.1. MATERIAL.....	86
2.2. EQUIPAMENTO E METODOLOGIA	87
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1. AVALIAÇÃO DOS FOLATOS EM CERVEJAS	89
4. CONCLUSÕES.....	99
5. AGRADECIMENTOS.....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CAPÍTULO 4	
FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM CERVEJAS BRASILEIRAS	
.....	105
RESUMO.....	107
ABSTRACT	108
1. INTRODUÇÃO.....	109
2. MATERIAIS E MÉTODO.....	112
2.1. MATERIAIS.....	112
2.2. EQUIPAMENTO E METODOLOGIA	113
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	115

3.2. RADICAL 2,2 DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH•).....	119
3.3. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DE FERRO (FRAP).....	123
4. CONCLUSÕES.....	126
5. AGRADECIMENTOS.....	126
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
CAPÍTULO 5	
TEOR DE TRANS-2-NONENAL EM CERVEJAS BRASILEIRAS.....	133
RESUMO.....	135
ABSTRACT	136
1. INTRODUÇÃO.....	137
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	138
2.1. MATERIAL.....	138
2.2. PREPARO DA AMOSTRA E ANÁLISE.....	138
2.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	139
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	140
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	140
3.2 RESULTADOS DAS AMOSTRAS.....	143
4. CONCLUSÕES.....	148
5. AGRADECIMENTOS.....	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
CONCLUSÕES GERAIS.....	153
APÊNDICES.....	155

RESUMO GERAL

No presente trabalho foram adaptados e aplicados métodos para a determinação do teor de folatos, avaliação de capacidade antioxidante e quantificação do composto trans-2-nonenal em cervejas brasileiras. Foram avaliadas 5 marcas de cervejas tipo Pilsen, sem álcool e Malzbier, nas embalagens lata e garrafa âmbar. Para determinação dos folatos (ácido fólico - AF, 10-metil-ácido fólico - 10Metil, 5-metiltetraidrofolato - 5Metil, 5-formiltetraidrofolato - 5Formil e 10-formil-ácido fólico - 10Formil) vitaminas do complexo B, empregou-se um método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na etapa cromatográfica utilizou-se coluna C18 e eluição por gradiente com fase móvel composta por ácido acético 2,0% ajustado a pH 2,8 e acetonitrila, a uma vazão de 0,5 mL/min. A detecção foi realizada com o detector de arranjo de diodos a 290nm para o AF e o 10Metil; e com detector de fluorescência a λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 360nm na detecção do 5Metil e 5Formil; e a λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 445nm para o 10Formil. Após sua validação, o método apresentou coeficientes de correlação variando de 0,9970 a 0,9999, limites de detecção de 0,07 a 2,42 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, e de quantificação entre 0,22 e 8,07 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Os coeficientes de variação (CV) ficaram entre 0,75 e 5,01% e a precisão intermediária entre 1,20 e 9,99%. Os ensaios de recuperação nos níveis avaliados estiveram entre 92 e 107%. Os folatos encontrados nas cervejas analisadas foram o 10Metil, o 5Metil e o 10Formil e os níveis totais da vitamina variaram de 18,26 a 23,99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Estas vitaminas foram monitoradas durante a vida de prateleira da bebida (6 meses), sendo avaliadas na cerveja recém fabricada e a cada 2 meses subsequentes. De modo geral o teor de folatos decresceu ao longo da vida de prateleira, e não foi possível constatar o efeito do tipo de embalagem sobre a vitamina. A avaliação em diferentes lotes resultou em grande variação, com CVs de até 52,42%. Para estabelecer o teor de fenólicos totais foi aplicado o método de Folin-Ciocalteu, pelo qual foram encontrados 47,05, 18,67 e 21,83 mg/100mL em equivalentes de ácido gálico (EAG), na cerveja Malzbier, Pilsen sem álcool e Pilsen, respectivamente. O tipo de embalagem utilizada, lata ou garrafa, apresentou relevância para o teor de fenólicos totais somente para a cerveja Pilsen, e a cerveja sem álcool foi a que mais apresentou variação do teor entre marcas. Para avaliação da capacidade antioxidante foram realizados ensaios utilizando o radical 2,2- difenil -1- picrilhidrazil (DPPH) e o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). Os

dois ensaios indicaram a cerveja Malzbier com maior capacidade antioxidante, corroborando com o teor de fenólicos totais. Para identificação e quantificação do trans-2-nonenal, um dos principais responsáveis pelo sabor envelhecido em cervejas, foi utilizado o método de headspace com microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS). Foi utilizada coluna 5%-fenil-metilpolisiloxano (HP-5MS) e a condição cromatográfica empregada teve início em temperatura de 60°C, variando 3 °C/min até atingir 100°C. Em seguida, uma rampa de 10 °C/min até atingir 200°C e permanência a 200°C por sete minutos para limpeza da coluna. O gás de arraste (hélio) teve vazão constante de 1,0 mL/min. Os íons monitorados para a identificação (m/z) foram 55, 70 e 83 (fonte de ionização de 70eV), após verificação do espectro de massas do composto. O teor de trans-2-nonenal encontrado variou de 0,11 a 0,46 µg/L nas cervejas em lata, estando acima de seu threshold. Para este composto foi encontrada diferença significativa entre amostras de um mesmo tipo de cerveja, porém não houve diferença significativa entre os três tipos de cerveja analisados. Este trabalho demonstrou que a cerveja brasileira possui substâncias benéficas à saúde humana, com teor similar a de outros alimentos, e que o trans-2-nonenal ainda é presente em quantidades acima do threshold na bebida, podendo comprometer sua qualidade. De modo geral, a embalagem, lata ou garrafa, não influenciou no teor das substâncias analisadas e a cerveja Malzbier se destacou pela maior capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Cerveja, folatos, vida-de-prateleira, CLAE, capacidade antioxidante, DPPH, FRAP, compostos fenólicos totais, trans-2-nonenal, GC-MS.

GENERAL ABSTRACT

In the present study methods were adapted and applied to quantify levels of folate, antioxidant capacity assessment and E-2-nonenal quantification in Brazilian beers. 5 brands of Pilsen, non-alcoholic and Malzbier beers were used, in can and amber bottle. For determination of folates (folic acid - FA, 10-methyl-folic acid - 10Methyl, 5-methyltetrahydrofolate - 5Methyl, 5-formyltetrahydrofolate - 5Formyl and 10-formyl-folic acid - 10Formyl) B vitamins, a method using liquid chromatography (HPLC) was employed. In the chromatographic step a C18 column was used and was applied a gradient elution with mobile phase consisting of an acetic acid 2.0% solution adjusted to pH 2.8 and acetonitrile, at a flow rate of 0.5 mL / min. The detection was performed with the diode array detector at 290nm for FA and 10Methyl, and with a fluorescence detector at λ_{exc} . 290nm and λ_{emis} . 360nm in the detection of 5Methyl and 5Formyl, and at λ_{exc} . 290nm and λ_{emis} . 445nm for the 10Formyl. After its validation, the method presented correlation coefficients ranging from 0.9970 to 0.9999 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$, detection limits from 0.07 to 2.42 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ and quantification limits between 0.22 and 8.07 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$. The standard deviation (SD) was between 0.75 and 5.01% and intermediate precision was from 1.20 to 9.99%. Tests of recovery levels were resulted between 92 and 107%. Folates found in beers were 10Methyl, 5Methyl and 10Formyl. The total folate levels found among types of fresh beers ranged from 18.26 to 23.99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. These vitamins were monitored during beer shelf life (6 months), being evaluated in freshly brewed beer and at every subsequent 2 months. Overall levels of folate found decreased over the shelf life, but it was not possible to verify the effect of package to protect beer against degradation of the vitamins. Evaluation in different batches showed a great variation, with SD up to 52.42%. To determine the total phenolic content was applied the Folin-Ciocalteu method, by which they were found 47.05, 18.67 and 21.83 in $\text{mg}/100\text{mL}$ equivalents gallic acid (EGA) for Malzbier beer, alcohol-free Pilsen and Pilsen, respectively. The type of packaging used, can or bottle, had relevance to the total phenolic content only for Pilsen beer. Nonalcoholic beer showed the highest variation. To evaluate the antioxidant capacity, tests using the radical 2,2 - diphenyl -1 - picrylhydrazyl (DPPH) and the ferric reduction antioxidant power (FRAP) were performed. The two tests indicated the beer Malzbier has the highest antioxidant capacity, which agrees with the content of total

phenolics. For identification and quantification of E-2-nonenal, a major cause of aged flavor in beers, it was used a headspace method with micro solid phase extraction and gas chromatography technique coupled with mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). A 5%-phenyl-methylpolisiloxane (HP-5MS) column was used. The chromatographic conditions used beginning in temperature of 60 °C, ranging from 3 °C / min up to 100 °C. Then, ramp of 10 °C / min until 200 °C and then stay at 200 °C for seven minutes to clean the column. The carrier gas (helium) had constant flow of 1.0 mL / min. The monitored ions were 55, 70 and 83 (m/z) (source of ionization 70eV), after verification of mass spectra of the compound. Levels of E-2-nonenal ranged from 0.11 to 0.46 µg/L in beer cans, being above its threshold. For this compound significant difference was found between samples of the same type of beer, but there was no significant difference between the three types of analyzed beer. This study showed that the Brazilian beer have beneficial substances to human health, with similar content to other food, and that the E-2-nonenal is still present in quantities above the threshold in the beverage, which can compromise its quality. In general, the packaging, can or bottle, did not influence the content of the analyzed substances, and Malzbier beer stood out for greater antioxidant capacity.

Keywords: Beer, folate, shelf life, HPLC, antioxidant, DPPH, FRAP, total phenolic compounds, E-2-nonenal, GC-MS.

INTRODUÇÃO GERAL

A cerveja existe desde a cultura Mediterrânea clássica, vinculada na antiguidade a fins terapêuticos. As primeiras referências históricas existem há mais de 5.000 anos a. C. com fabricação pelos Sumérios e Egípcios, e os Babilônios já fabricavam mais de dezesseis tipos de cerveja de cevada, trigo e mel, há mais de 4.000 anos. A partir do Egito - como demonstram hieróglifos - a cerveja se difundiu entre os povos orientais, sendo o responsável pelo ingresso da bebida na bacia do Mediterrâneo e, de lá, para a Europa e todo o mundo (Hough, 1990; Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000).

A cerveja é produzida da fermentação alcoólica do mosto de cereal malteado, geralmente malte de cevada, e lúpulo, sendo facultativa a adição de outra matéria-prima amilácea (Brasil, 1997). A variação desses ingredientes e/ou do processo de fabricação resulta em diferentes tipos de cerveja (Rodrigues, 2000; Martinez, 2004).

De acordo com o último levantamento do Sindicerv, o mercado cervejeiro no Brasil produziu 10,34 bilhões de litros de cerveja ao longo de 2007 e o consumo per capita foi de 56 litros. O setor faturou R\$ 25,8 bilhões e investiu R\$ 3 bilhões nos últimos cinco anos. O Brasil ocupa a quinta posição no ranking mundial dos produtores de cerveja (Sindicerv, 2010).

Durante a Feira Internacional de Tecnologia em Cerveja, Brasil Brau 2009, foi destacado o papel do Brasil no mercado mundial da cerveja. Segundo Michael Schadler, diretor de marketing internacional da USA Hops, associação que reúne os produtores de lúpulo dos Estados Unidos, o Brasil não conta apenas como quinto mercado mundial da bebida, figura também entre os três principais destinos de exportação do lúpulo americano, já que o país não produz lúpulo e que entre os quatro primeiros produtores mundiais acima do Brasil, China, Estados Unidos, Alemanha e Rússia, somente este último não tem produção própria de lúpulo (Cervesia, 2009). Ainda, segundo o IBGE, enquanto a produção industrial total do País despencou cerca de 15% em abril de 2009, em comparação com o mesmo mês em 2008, os fabricantes de bebidas registraram alta de 5% (IBGE, 2010).

Conforme aumenta o consumo de cerveja, cada vez mais são realizadas pesquisas envolvendo a bebida, tanto no aspecto da saúde e compostos funcionais, como para melhoramento do paladar e aroma da cerveja. Assim, são também cada vez mais

necessários métodos que simplifiquem esta avaliação e tornem o controle do teor dessas substâncias mais prático.

Sabe-se que o teor de folatos na cerveja é significativo (Catharino, 2004; Jägerstad et al., 2005) já que a própria levedura pela fermentação produz altas quantidades da vitamina (Brody, 1991, Seyoum e Selhub, 1998; Osseyi, Ewhling e Albrecht, 2001; Kariluoto et al., 2004). Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico, uma vitamina do complexo B (Brody, 1991; Brody, 1994; Brubacker, 1985; Zanini e Oga, 1994).

Desde a década de 80 verifica-se um acréscimo nas evidências da relação entre a deficiência de folatos e o risco de defeitos em tubo neural de fetos durante a gestação, de doenças cardíacas, de certas formas de tumores e mal de Alzheimer, entre outras (Hawkes e Villota, 1989; Scott, Rébeille e Fletcher, 2000; Gross, 2009). Os folatos também estão envolvidos na produção da mielina, a principal proteína que participa da biossíntese de camadas de lipídios que separam os nervos axônios. Deste modo, a carência de folatos também vem sendo associada a doenças degenerativas por diminuir a biossíntese de mielina (Scott, Rébeille e Fletcher, 2000; Eudes et al., 2009).

Assim como os folatos, a ingestão de compostos antioxidantes também reduz o risco da ocorrência de certas doenças como o câncer e insuficiência coronária (Sies, 1991; Gey e Puska, 1989; Gerster, 1991; Namiki, 1990; Ramarathnam et al., 1995; Papadopoulos e Frazier, 2004), inflamação e doenças relacionadas ao envelhecimento, por exemplo esclerose múltipla, mal de Parkinson, doença auto-imune, isquemia, anemia e demência senil (Halliwell e Gutteridge, 1990). Uma das principais fontes de polifenóis é a cerveja (Freitas, 2006), sendo essencialmente provenientes da casca de cevada malteada e do lúpulo. Também aparecem compostos mais complexos como os taninos (González San José, Muniz Rodrigues e Vall Bellés, 2001; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002). A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, mas inferior à do vinho tinto, nesses produtos os compostos antioxidantes são diferentes devido à composição do malte e do lúpulo diferir da composição das uvas (Lugasi, 2003).

Quanto à qualidade sensorial da cerveja, um dos compostos que mais contribui negativamente é o trans-2-nonenal, já que uma concentração deste aldeído compreendida entre 0,05 ppb e 0,1 ppb já é suficiente para fazer sobressair o sabor de papel-cartão (Collin e Noël, 1994). O aumento de sua concentração na bebida está relacionado ao processo oxidativo (Meilgaard, 1975; Liegeois et al., 2002; Santos et al., 2003, Saison et al., 2009), e apesar de ser característico em cervejas envelhecidas,

muitas vezes o sabor oxidado é encontrado em cervejas com menos de 3 meses de vida de prateleira (Santos et al., 2003).

Deste modo, com o mercado de cerveja em expansão, este trabalho buscou aplicar e aperfeiçoar métodos para identificação e quantificação de alguns destes compostos na cerveja brasileira e compará-los entre tipos diferentes como a Pilsen, sem álcool e Malzbier, além de possível influência do tipo de embalagem.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1997.

BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2ed. rev. New York: Marcel Decker, 1991. p. 453-490.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. Hawaii: Academic Press, 1994. 658 p.

BRUBACKER, G.; MULLER-MULLOT, W.; SOUTHGATE, D. A. T. **Methods for the determination of vitamins in food**, recommended by COST 91. Elsevier Appl. Sci. Publ., 1985. 166 p.

CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Folatos em Alimentos**, 2004. 96 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CERVESIA E-NEWS. **M Reinold Tecnologia em Qualidade e Produtividade Ltda**, v. 66, 2009.

COLLIN, S., NOËL, S., Reactions Chimiques et Enzymatiques Productrices d'arômes au Brassage, **Cerevisia and biotechnology**, v.19, p. 25-32.1994.

EUDES A., KUNJI E. R. S., NOIRIEL A., KLAUS S. M. J., VICKERS T. J., BEVERLEY S. M., GREGORY J. F., HANSON A. D.; Identification of Transport-Critical Residues in a Folate Transporter from the Folate-Biopterin Transporter (FBT) Family. **The Journal of Biological Chemistry**, 2009.

FREITAS G. L., **Potencial Antioxidante e Compostos Fenólicos na Cerveja, Chopp, Cevada (Hordeum Vulgare L.) e no Bagaço de Brassagem**, 2006. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos), Centro de Ciências Agrárias; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006

MARTÍNEZ, J. R. El consumo moderado de cerveza en una dieta sana e equilibrada puede reducir el riesgo cardiovascular. **Cerveza y Salud**, v. 162, p. 65-68, 2004.

GERSTER, H. Potential role of B-carotene in the prevention of cardiovascular disease. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 61, p. 277-91, 1991.

GEY, K. F. PUSKA, P. Plasma vitamin E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross culture epidemiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 570, p. 268-282, 1989.

GONZALEZ SAN JOSÉ, M. L.; MUNIZ RODRIGUEZ, P.; VALL BELLÉS, Y. V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo (1ª parte). **Cerveza y Salud**, v. 154, p. 47-54, 2001.

GROSS M., Blood folate and beta-carotene are associated with asymptomatic Alzheimer's disease: The Nun Study. In: **Alzheimer's and Dementia**, Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease. *Alzheimer's and Dementia*. v.5, n.4, p.129-130, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HAWKES, J.G.; VILLOTA, T.H. Folates in foods: Reactivity, Stability during processing and nutritional implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.6, p. 439-539, 1989.

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

HOUGH, J. S., **Biología de la cerveza y de la malta**. Tradução Gonzáles J. B., 1ed, Zaragoza: ACRIBIA, 1990. 194 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial Mensal Produção Física – Brasil de março para abril de 2009, indústria cresceu 1,1%. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1378&id_pagina=1> Acesso em: 03 jan. 2010.

JÄGERSTAD, M., PIIRONEN, V., WALKER, C., ROS, G., CARNOVALE, E., HOLASOVA, M., NAU, H., Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p. 98-306, 2005.

KARILUOTO, S., VAHTERISTO, L., SALOVAARA, H., KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., PIIRONEN, V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chemistry**, v.81, n.1, p.134-139, 2004.

LIEGEOIS C, MEURENS N, BADOT C, COLLIN S. Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7634-7638, 2002.

LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. **Acta Alimentaria**, v.32, n.2, p.181-192, 2003.

MATAIX, J. La cerveza, tradición y cultura mediterránea. **Cerveza y Salud**, v.161, p.41-44, 2004.

MARTÍNEZ, J. R. El consumo moderado de cerveza en una dieta sana e equilibrada puede reducir el riesgo cardiovascular. **Cerveza y Salud**, v.162, p.65-68, 2004.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.12, p.151-168, 1975.

NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29. n.4, p.273-300, 1990.

OSSEYI, E. S., EWHLING, R. L., ALBRECHT, J. A., HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chemistry**, v.78, n.4, p.375-378, 2001.

PAPADOPOULOU, A.; FRAZIER, R. A. Characterization of protein-polyphenol interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.186-190, 2004.

RAMARATHNAM N, OSAWA T, OCHI H, KAWAKISHI S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, n.3, p.75-82. 1995.

REINOLD, M. R., **Manual Prático de Cervejaria**. 1ed. São Paulo: ADEN, 1997, 214 p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p. 933-956, 1997.

RODRIGUES, M. C. P. **Perfil sensorial e aceitação de cervejas comercializadas no mercado brasileiro – treinamento e monitoramento de julgadores**, 2001, 196p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SAISON D., DE SCHUTTER D. P., UYTENHOVE B, DELVAUX F., DELVAUX F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v.114, p.1206-1215, 2009.

SANTOS J. R.; CARNEIRO J. R.; GUIDO L. F.; ALMEIDA P. J.; RODRIGUES J. A.; BARROS A. A.. Determination of *E*-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection Assay for the evaluation of beer ageing. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.395-402, 2003.

SEYOUN E., SELHUB J., Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action, **Journal of Nutrition**, v.128, p.1956–1960, 1998.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.795-824, 2000.

SIES, H. Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidant. **Academic Press**, London. 1991.

SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br> > Acesso em: 02 jan. 2010.

VENTURINI FILHO, W. G., **Tecnologia de Cerveja**. 1ed. Jabotical: Funep, 2000. 83 p.

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, 739 p.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o teor de folatos, capacidade antioxidante e presença de trans-2-nonenal em cervejas brasileiras tipo Pilsen, Pilsen sem álcool e Malzbier.

Objetivos específicos:

- Validar um método por CLAE para a detecção de folatos em cervejas.
- Avaliar o teor dos folatos presentes nos diferentes tipos de cerveja e acompanhar a estabilidade durante a vida de prateleira do produto (6 meses).
- Observar a influência da embalagem (lata e garrafa) no teor de folatos em cerveja.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos diferentes tipos de cerveja e compará-la por dois diferentes métodos.
- Quantificar compostos fenólicos totais na cerveja.
- Observar a influência da embalagem (lata e garrafa) na capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais da cerveja.
- Determinar o teor de trans-2-nonenal nos diferentes tipos de cerveja acondicionadas em lata.

Capítulo 1

Cervejas - compostos funcionais e de controle de qualidade – Uma Revisão

Ana Cecília P. Rybka e Helena T. Godoy*

Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

* helena@fea.unicamp.br

RESUMO

Cerveja é qualquer uma das variedades de bebidas alcoólicas produzidas pela fermentação de matéria-prima como amido, cereais ou outras fontes vegetais. Em termos históricos, a cerveja já era conhecida pelos sumérios, egípcios e mesopotâmios, desde cerca de 5. 000 a.C. Como os ingredientes usados para fazer cerveja diferem de acordo o tipo e a qualidade das matérias-primas, as características (tipo, sabor e cor) variam amplamente. Podem ser classificadas pelo teor de álcool e extrato, pelo malte ou de acordo com o tipo de fermentação. As cervejas de alta fermentação são aquelas cujas leveduras flutuam, durante o processo. A maior parte das cervejas é de baixa fermentação, ou seja, quando expostas à temperaturas entre 9°C e 14°C, o levedo fica depositado no fundo do tanque, sendo conhecidas como “Lager”. É uma bebida amplamente consumida no Brasil, que só perde em volume, para a China, Estados Unidos, Alemanha e Rússia. Os tipos de cerveja mais consumidos no país são a Pilsen, com consumo de cerca de 98%, e a Malzbier. O processo de fermentação da cerveja, através de leveduras, aumenta os níveis de folatos presentes, além dos folatos provenientes dos grãos. Os folatos são vitaminas essenciais à saúde, prevenindo malformações congênitas, anemia megaloblástica, diversos tipos de câncer e doenças crônicas, além de auxiliar a formação de DNA e a conversão de homocisteína em metionina. A cerveja também possui alto poder antioxidante, especialmente através dos polifenóis, protegendo o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que possam causar oxidação excessiva, e prevenindo contra patologias como o câncer, insuficiência coronária, inflamação, esclerose múltipla, mal de Parkinson, doença auto-imune, isquemia, anemia e demência senil. O alto consumo de cerveja no Brasil se deve, entre outros fatores ao sabor fresco que agrada a população. Este sabor é resultado de uma interação complexa entre centenas de compostos químicos que podem ocasionar muitas reações durante seu armazenamento, tendo por resultado uma diminuição de notas frescas. Os índices excessivos de oxigênio, as altas temperaturas e os tempos durante a pasteurização da cerveja podem conduzir ao gosto do pasteurizado, para o qual um dos compostos mais citados como responsável é o trans-2-nonenal. Ele possui um *threshold* muito baixo, já que uma concentração deste aldeído compreendida entre 0,05 ppb e 0,1 ppb é suficiente para fazer sobressair este sabor característico.

Palavras-chave: Cerveja, folatos, antioxidantes, trans-2-nonenal.

ABSTRACT

Drinks called as beer are any variety of alcoholic beverages produced by fermentation of starchy matter, derived from grain or other plant sources. Historically, beer was known by the Sumerians, Egyptians and Mesopotamians, from about 5,000 b. C.. As the ingredients used to make beer differ according to type and quality of raw material, characteristics (type, flavor and color) vary widely. They can be classified by the alcohol and extract quantity, and malt or according to the type of fermentation. The top-fermented beers are those whose yeast float during the process. Most of the beer fermentation is low, in other words, when exposed to temperatures between 9 °C and 14 °C, the yeast settles at the bottom of the tank, known as “Lager”. It is a beverage widely consumed in Brazil, being only behind to China, the United States, Germany and Russia in volume. The types of beer more consumed in the country are Pilsen, with consumption of about 98%, and Malzbier. The process of beer fermentation by yeast increases folate levels, besides folates from grain. Folate is a vitamin essential to health by preventing birth defects, megaloblastic anemia, various cancers and chronic diseases, and helping the formation of DNA and the conversion of homocysteine to methionine. Beer also has a high antioxidant power, especially through the polyphenols, and protect the biological system against the harmful effects of processes or reactions that may cause excessive oxidation, and preventing against diseases such as cancer, coronary heart disease, inflammation, multiple sclerosis, Parkinson's disease, autoimmune disease, ischemia, anemia and senile dementia. The high consumption of beer in Brazil is due, among other factors, the fresh flavor that appeals to consumers. This flavor is the result of a complex interaction of hundreds of chemical compounds that can cause many reactions during storage, resulting in a decrease of fresh notes. The excessive levels of oxygen, high temperatures and times during the pasteurization can lead to the taste of pasteurized, and one of the more cited compounds as responsible for this, is the trans-2-nonenal. It has a very low threshold, since concentrations between 0.05 ppb and 0.1 ppb are sufficient to bring out its flavor. This study aimed to review beer characteristics, with some compounds responsible for their health benefits, as well as a compound responsible for the taste of aged beer.

Key-words: Beer, folates, antioxidants, E-2-nonenal.

1. Cerveja

1.1. Histórico

A cerveja já era conhecida pelas populações antigas e era uma bebida muito popular em clima não propício ao cultivo de uvas. A maioria das bebidas elaboradas com cereais nos últimos 8.000 anos é hoje considerada como cerveja (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000).

Sua origem histórica é desconhecida. Sabe-se que os sumérios e os egípcios produziam cerveja, há mais de 5.000 anos antes de Cristo, e os babilônios já fabricavam mais de dezesseis tipos de cerveja de cevada, trigo e mel, há mais de 4.000 anos (Hough, 1990; Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000). O mais antigo código de leis conhecido, o de Hamurabi na Babilônia (datado de 1.800 anos antes de Cristo), declarava que a pena de morte poderia ser imposta a quem diluía a cerveja que vendia. Igualmente, foi encontrada em papiros egípcios, de cerca de 1.300 anos antes de Cristo, uma regulamentação da venda de cerveja (Santos, 2002). A bebida também foi produzida por gregos e romanos durante o apogeu destas civilizações (Venturini Filho, 2000).

Na América do Sul, os incas já bebiam cervejas elaboradas a partir de grãos (milho), e há ainda antigas referências às cervejarias milenares na China e no Japão. Também no continente africano existem indícios de que a cerveja africana seja uma bebida tradicional do Zaire e países vizinhos (Reinold, 1997).

O lúpulo já era conhecido em algumas partes do mundo no século VIII, porém apenas no século XVI tornou-se conhecido e popular na Europa (Inglaterra) como uma planta que adicionava sabor (Hough, 1990; Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000).

A cerveja foi usada na idade média como mercadoria para comércio, pagamento e impostos. No século XIV, a cidade de Hamburgo, na Alemanha, era o centro cervejeiro da Europa, com mais de mil mestres cervejeiros (Reinold, 1997). No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, no início do século XIX, durante a permanência da família real portuguesa no território brasileiro (Hough, 1990; Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000). Nesta época, a cerveja consumida era importada da Europa. Em 1888 foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a primeira cervejaria brasileira e, em 1891, na cidade de São Paulo (Venturini Filho, 2000).

1.2. Descrição

A cerveja é um produto tradicional e aceito popularmente. Genericamente pode ser definida como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir do malte “cevada germinada”, lúpulo, fermento e água de boa qualidade (Rodrigues, 2000). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo, na qual o malte e o lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos e parte do malte de cevada pode ser substituído por cereais como a cevada, o arroz, o trigo, o centeio, o milho, a aveia e o sorgo, todos integrais, em flocos ou a sua parte amilácea (Brasil, 1997).

Os princípios do processo de produção de cerveja devem ser mantidos constantes, independente do tipo de cerveja a ser fabricado. Porém, associadas a esses princípios, diferentes variáveis de fabricação irão determinar a qualidade final do produto e gerar diversificações ou diferentes tipos de cerveja. Dentre estas variáveis de fabricação destacam-se: as variáveis de cevada utilizadas, o local e a estação do ano de cultivo, o tipo de malteação principalmente na secagem, o método de preparo do macerado, o uso de adjuntos, o tipo de filtração do mosto, a água utilizada, leve ou pesada, o tempo de cozimento, os tipos de lúpulo usados e o momento que são adicionados do cozimento, o tipo de fermento, o tempo de fermentação e maturação, o tipo ou ausência de filtração da cerveja, a decisão de pasteurizar ou não e o controle do binômio tempo-temperatura em todas as fases de fabricação (Varnam e Sutherland, 1994; Rodrigues, 2000).

As cervejas de alta fermentação são aquelas cujas leveduras flutuam, durante o processo, após fermentar o mosto, gerando um produto de cor cobre-avermelhada, de sabor forte, ligeiramente ácido e com teor alcoólico entre 4% e 8%. A maior parte das cervejas é de baixa fermentação, ou seja, o levedo fica depositado no fundo do tanque (Hough, 1990; Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000).

As leveduras são responsáveis pela transformação dos açúcares do mosto em álcool e gás carbônico, e na indústria cervejeira distinguem-se fundamentalmente duas espécies: *Saccharomyces cerevisiae* (utilizada em cervejas claras, de alta fermentação, ou seja, que fermentam entre 13 e 16°C) e *Saccharomyces uvarum* ou *carlsbergensis* (utilizadas em cervejas de baixa fermentação, entre 4 e 8°C) (Varnam e Sutherland, 1994; Haj-Issa, 2000).

Segundo Haj-Isa (2000), Filho (2000), Santos (2002) e Sindicerv (2009), as etapas de fabricação da cerveja são divididas em:

1.2.1 Preparo do mosto

A primeira fase do processo produtivo ocorre quando as matérias-primas (malte, lúpulo e adjuntos) são misturadas em água e dissolvidas, visando a obtenção de uma mistura líquida açucarada chamada mosto, que é a base para a futura cerveja.

1.2.2 Fermentação

Após o resfriamento, o mosto recebe fermento e é acondicionado em grandes tanques, chamados de fermentadores (onde começa a fase de fermentação). Nessa etapa, o fermento transforma o açúcar do mosto em álcool e gás carbônico, obtendo assim energia necessária à sua sobrevivência. Durante todo o processo é muito importante o controle preciso da temperatura, pois somente na temperatura correta o fermento produzirá cerveja com o sabor adequado. A fermentação é certamente a fase mais importante para o paladar da cerveja, visto que, paralelamente à transformação de açúcar em álcool e gás carbônico, o fermento produz outras substâncias, em quantidades muito pequenas, mas que são as responsáveis pelo aroma e pelo sabor do produto.

1.2.3 Maturação

Uma vez concluída a fermentação, a cerveja é resfriada a zero grau, a maior parte do fermento é separada por decantação (sedimentação) e tem início a maturação. Nessa fase, pequenas transformações ocorrem para aprimorar o sabor da cerveja. Algumas substâncias indesejadas oriundas da fermentação são eliminadas e o açúcar residual presente é consumido pelas células de fermento remanescentes, em um fenômeno conhecido por fermentação secundária. A maturação costuma levar de 6 a 30 dias, variando de uma cervejaria para outra. Ao final dessa fase, a cerveja está praticamente concluída, com aroma e sabor finais definidos.

1.2.4 Filtração

Após maturada, a cerveja passa por uma filtração, que visa eliminar partículas em suspensão, principalmente células de fermento, deixando a bebida transparente e brilhante. A filtração não altera a composição e o sabor da cerveja, mas é fundamental para garantir sua apresentação, conferindo-lhe um aspecto cristalino.

1.2.5 Enchimento e Pasteurização

O enchimento é a fase final do processo de produção. Pode ser feito em garrafas, latas e barris. Logo após o enchimento, a cerveja é submetida ao processo de pasteurização, principalmente quando são envasadas em garrafas ou latas (no barril, a cerveja normalmente não é pasteurizada e por isso recebe o nome de chope). A cerveja é submetida a um aquecimento a 60°C e posterior resfriamento, para garantir maior estabilidade ao produto. É, então, possível às cervejarias assegurar uma data de validade ao produto de seis meses após sua fabricação.

A Figura 1 apresenta um esquema simplificado das principais etapas do processo de fabricação da cerveja.

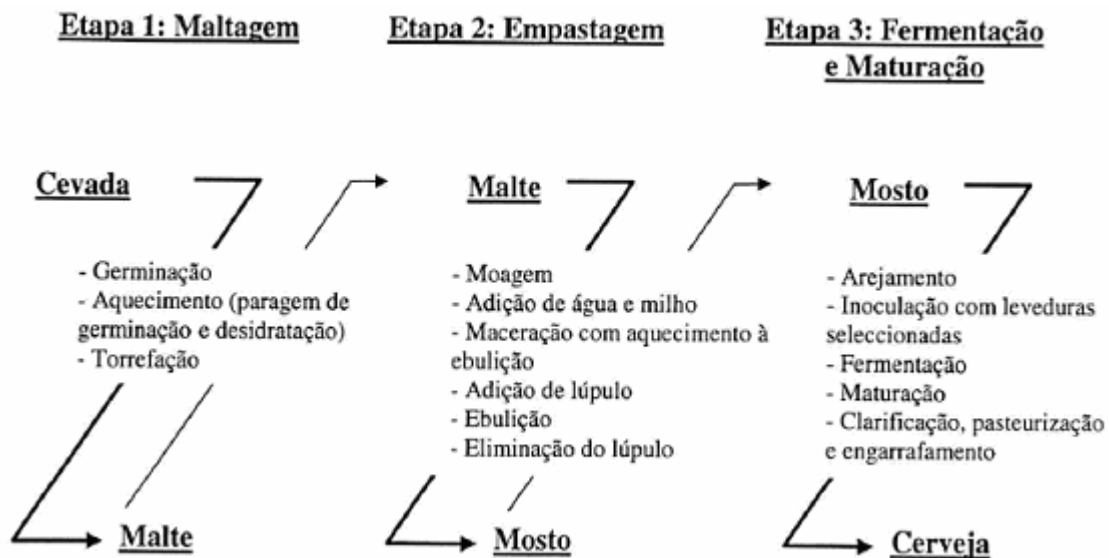


Figura 1: Diagrama esquemático das principais etapas do processo de fabricação da cerveja (Santos, 2002).

1.3. Tipos de Cerveja

De forma geral, pode-se afirmar que existem dois grandes seguimentos de cerveja: as “Ale” e as “Lager”. As primeiras são produzidas por leveduras de alta fermentação entre elas Pale Ale, Brown Ale, Mild, Bitter, Stout, Porter e Barley Wine, e as segundas são fabricadas utilizando-se leveduras de baixa fermentação e normalmente maturadas a baixa temperatura. Os tipos mais representativos de “Lager” são: Pilsen, Munich, Boch, Export e Malzbier (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000). Alguns tipos de

cerveja produzidos, com sua origem e principais características estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Alguns tipos de cerveja produzidos ao redor do mundo

TIPOS DE CERVEJA				
CERVEJA	ORIGEM	COLORAÇÃO	TEOR ALCOÓLICO	FERMENTAÇÃO
Pilsen	República Checa	Clara	Médio	Baixa
Stout	Inglaterra	Escura	Alto	Geralmente Alta
Porter	Inglaterra	Escura	Alto	Alta ou Baixa
Munich	Alemanha	Escura	Médio	Baixa
Bock	Alemanha	Escura	Alto	Baixa
Malzbier	Alemanha	Escura	Alto	Baixa
Ice	Canadá	Clara	Alto	-

Fonte: Sindicerv (2009).

Os principais tipos de cerveja consumidos no Brasil são Pilsen, Stout, Munich, Malzbier e Bock (Reinold, 1997).

1.3.1 Pilsen

A cerveja do tipo Pilsen nasceu em Pils, na Tchecoslováquia, em 1842, e é a mais conhecida e consumida no mundo. De sabor delicado, leve, clara e de baixo teor alcoólico (entre 3% e 5%), é também a preferida dos brasileiros. No Brasil, o consumo da Pilsen chega a 98% do total ingerido (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000; Sindicerv, 2009).

1.3.2 Stout

Originária da Inglaterra e Irlanda, a stout é feita com cevada torrada e possui um sabor que associa o amargo do lúpulo ao adocicado do malte. É elaborada com maltes especiais - escuros - e extrato primitivo de 15%. A fermentação é geralmente alta. Sua cor é escura e seu teor de álcool e extrato são altos (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000; Sindicerv, 2009).

1.3.3 Munich

Aperfeiçoada em Munique, na Alemanha, por volta de 1830. Indica uma cerveja “Larger” de cor castanho escura. Apresenta malte tostado, porém sem sabor de torrado. Apresenta teor de extrato original de 12,7% m/m e 5,0% de álcool em volume, corpo

médio a cheio, paladar de malte mas não doce, e amargor leve (menor que a Pilsen) (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000; Sindicerv, 2009).

1.3.4 Malzbier

A tradicional Malzbier é produzida a partir de malte tipo Viena, que confere à bebida a coloração âmbar-avermelhada. Utiliza-se levedura de baixa fermentação. Sua maturação é extremamente longa, chegando a mais de três meses de armazenamento. O extrato original da cerveja é de 13,0-13,5% m/m, a apresenta teor alcoólico acima de 5,0% em volume. É uma cerveja meio forte, de corpo pronunciado, sabor de malte mais concentrado no aroma do que no gosto (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000; Sindicerv, 2009).

1.3.5 Bock

A cerveja tipo bock é outra “Lager” de aceitação mundial por ter um sabor mais forte e encorpado, geralmente de cor escura, com teor alcóolico variando entre 5 e 7%. O malte usado na sua preparação é mais torrado e caramelizado, o que transmite um sabor menos amargo. A sua espuma é cremosa e resulta do prolongado processo de maturação e fermentação (Santos, 2002). É originária da cidade de Einbeck, na Alemanha. Tem baixa fermentação e alto teor alcoólico (Reinold, 1997; Venturini Filho, 2000; Sindicerv, 2009).

1.4. Mercado

Segundo Haj-Isa (2000), a potencialidade do mercado cervejeiro no Brasil é enorme por, entre outros motivos, grande parte da população brasileira ser jovem, faixa etária em que o consumo de cerveja é maior, e pela política de produção e de marketing das empresas estarem em expansão. Além do Brasil, por ser um país tropical, possuir tudo para a irrestrita aceitação da cerveja pelos consumidores (Bracco, 1986).

O Jornal Folha online, em 20 de julho de 2009, publicou que o mercado de vendas de cerveja cresceu quase 4,0% em maio de 2009 em relação ao mês anterior. As vendas da bebida em volume aumentaram 3,7% entre abril e maio (para 1,2 bilhão de litros), subiram 4,5% em volume e 9,4% em valores (Datamark, 2009). No mercado de cerveja, o Brasil só perde, em volume, para a China (35 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,7 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de

litros/ano). O consumo da bebida, em 2007, apresentou crescimento em relação ao ano anterior, totalizando 10,34 bilhões de litros (Sindicerv, 2009).

As Figuras 2 e 3 ilustram o consumo e produção de cerveja no Brasil, respectivamente.

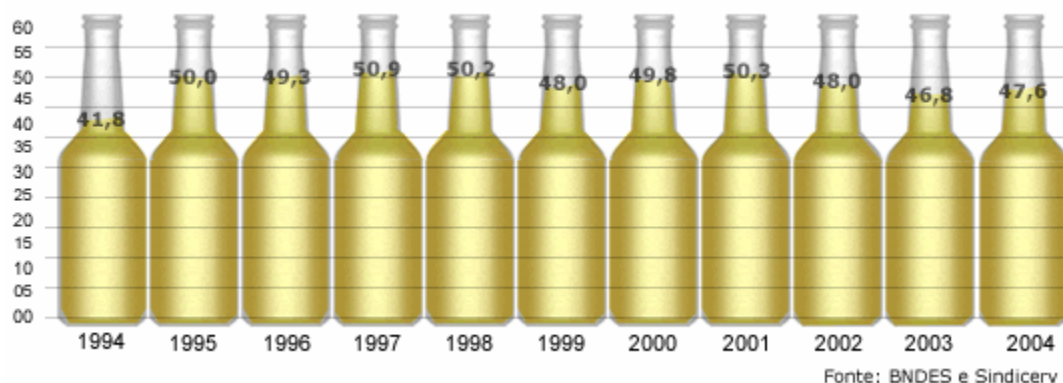


Figura 2: Consumo per Capita de cerveja no Brasil (litros por ano) (Sindicerv, 2010).



Figura 3: Produção de cerveja no Brasil (bilhões de litros) (Sindicerv, 2010).

1.5. Álcool

O consumo moderado de cerveja e vinho, ao contrário do que acontece com o consumo excessivo, pode fornecer aos consumidores substâncias que apresentam efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, como distúrbios no coração e algumas formas de trombose (Fagrell et al., 1999, Hendriks e Rimm, 2004), conforme demonstrado em estudos por todo o mundo. Deste modo, estima-se que a ingestão de 30g de álcool por dia (cerca de três copos de cerveja), pode reduzir o risco de doenças coronárias em 25% (Rimm et al., 1999). A explicação para esta situação reside no fato de a quantidade

de colesterol no sangue (*high density lipoprotein* HDL, o bom colesterol) aumentar quando se consome álcool, diminuindo assim o risco de doenças. Pesquisas realizadas mostram que dois copos de cerveja por dia (20g de álcool) pode aumentar o colesterol HDL na ordem dos 4,0% (McConnell et al., 1997). É claro que o consumo em excesso não acresce este valor, ao contrário, pode provocar vários problemas em outros sistemas do organismo humano. Outra explicação para os benefícios descritos, baseia-se na tendência que existe para a redução do aparecimento de coágulos no sangue quando se consome álcool (Gorinsten et al., 1997). Outras pesquisas foram efetuadas no sentido de se aferir a influência do consumo de álcool em certo tipo de doenças. Deste modo, obtiveram-se resultados que evidenciam que o consumo moderado de cerveja ou vinho pode proteger contra a formação de pedra na vesícula (Leitzmann et al., 1999), osteoporose (Charles et al., 1999) e até diabetes (Rimm et al., 1995).

Cabe ressaltar que o consumo de bebidas alcoólicas deve ser, além de moderado, realizado apenas por consumidores saudáveis, maiores de idade e não gestantes.

2. Folatos

2.1. Descrição

O termo folato é utilizado para um grupo de vitaminas hidrossolúveis com estruturas e atividades semelhantes ao ácido fólico (Brody, 1991; Zanini e Oga, 1994, de Bree et al., 1997). São vitaminas essenciais, que fazem parte do grupo das vitaminas do complexo B, sendo o ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico) conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₁₁, vitamina B₉ e vitamina M (Brody, 1991; Zanini e Oga, 1994).

Os folatos representam um grupo de compostos que variam pelo estado de oxidação da estrutura do anel de pteridina e pelo seu número de resíduos de glutamatos conjugados (Eittenmiller, Landen e Augustin, 1998; Brouwer, 2008). Estão naturalmente presentes em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico (Franco, 1992).

Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetraidrofolato o congênere majoritário (Czeize e Dudas, 1992; Zanini e Oga, 1994). O ácido pteroilglutâmico (PteGlu-1) é estrutura química comum aos folatos, suas diferentes formas (Figura 4) são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano (Goodman e Gilman, 1991).

A estrutura química dos folatos compreende um anel de pteridina ligado ao ácido p-aminobenzóico (PABA), que por sua vez está ligado, através da carboxila do grupo amina, ao ácido glutâmico. O anel pteridina pode existir em três estados de oxidação. Os grupos de um carbono podem estar nas posições N₅ ou N₁₀ e podem diferir no estado oxidado, existindo como folatos derivados de formil, metil ou formaldeído. Além destas variáveis estruturais, a maioria dos folatos naturais se encontra primariamente na forma reduzida e ligados a resíduos de ácido glutâmico, que variam de 3 a 11 unidades dependendo da origem do alimento (Hanson e Gregory, 2002).

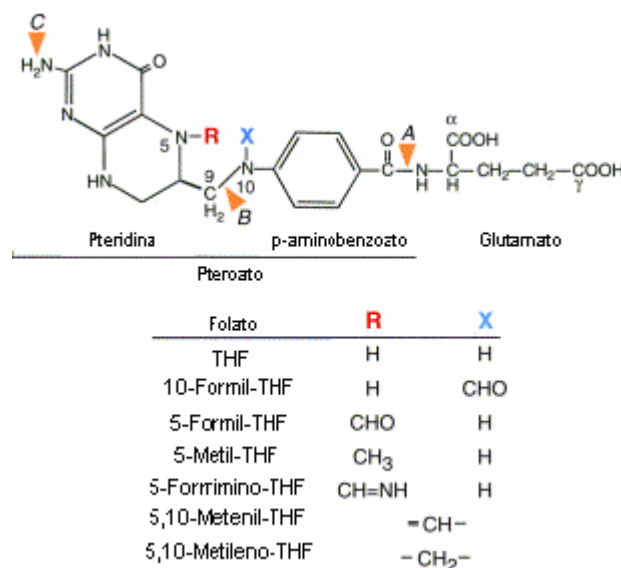


Figura 4: Estrutura química do Tetrahydrofolato e os derivados da substituição dos grupos R e X por unidades de 1 carbono – As letras A, B e C marcam os locais onde ocorre o ataque das enzimas catalíticas de bactérias e nos animais (Hanson e Gregory, 2002).

2.2. Biossíntese

Os folatos têm os resíduos de glutamatos unidos ao primeiro glutamato por γ -ligações, e a maioria das enzimas que utilizam folatos como substrato preferem estas formas de poliglutamatos. Estão em níveis de traços nas plantas ($\leq 5 \text{ nmol g}^{-1}$) e todos têm grau de instabilidade variável, particularmente, pelo rompimento oxidativo em fragmentos da pteridina e do PABA-glutamil. Os folatos são, entretanto, estáveis *in vivo*, quando são ligados a proteínas (Scott, Rébeille e Fletcher, 2000).

Além de serem vitais para plantas, os folatos são requeridos na dieta humana porque, ao contrário das plantas, os seres humanos não possuem as enzimas para a

síntese de folatos. Por isso uma alimentação rica de vegetais é importante para a ingestão da vitamina (Scott, et al. 2002).

A rota do ácido shiquimico foi descoberta como a rota biossintética dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, e triptofano), possuindo o corismato como intermediário (Haslam, 1993). Esta rota foi encontrada somente nos microorganismos e nas plantas (Scott et al., 2002). A partir da molécula de corismato formada na rota, é que são sintetizadas diversas classes de compostos, inclusive os folatos (Figura 5).

As etapas do ciclo da síntese dos folatos nos vegetais ainda não estão totalmente esclarecidas, mas, provavelmente, são as mesmas encontradas nas bactérias. Parte da pteridina é formada de GTP, e o PABA é formado de corismato. A pteridina e as unidades de PABA são condensadas, glutamiladas e reduzidas para obter o tetraidrofolato, e então, é adicionada a cauda do poliglutamil. Das 11 etapas, nove são mediadas por enzimas específicas (Green et al., 1996).

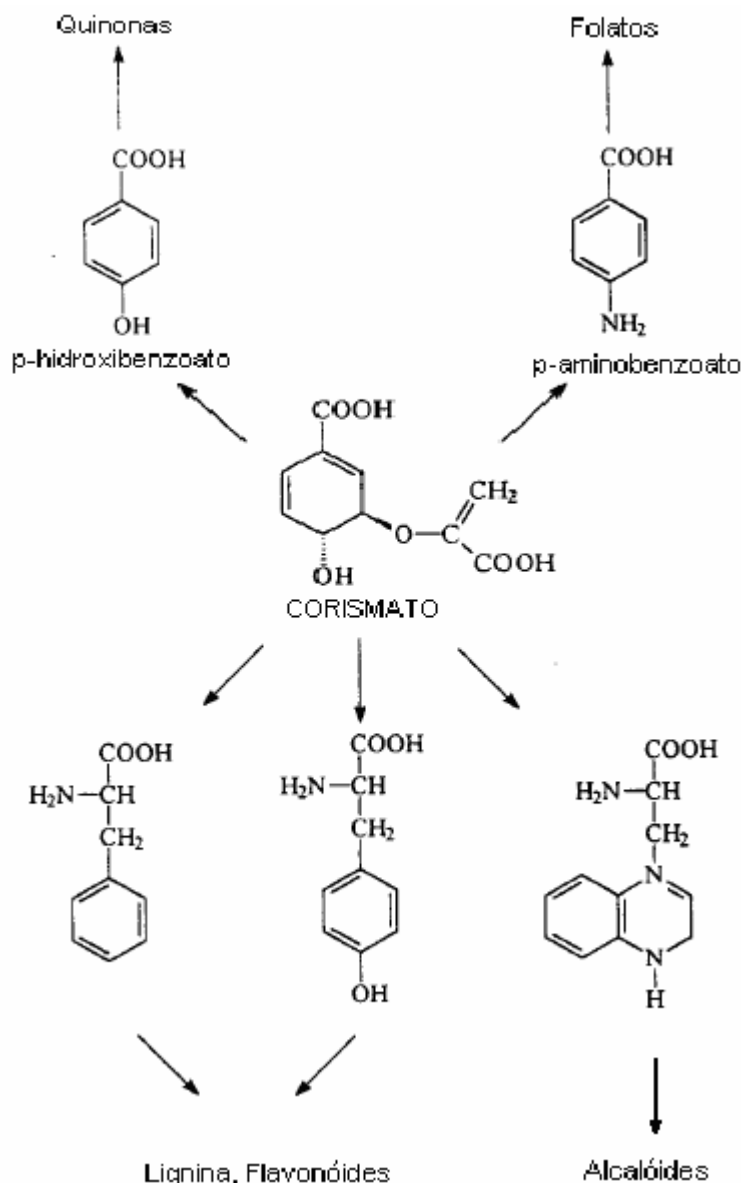


Figura 5: O corismato é precursor para metabólicos primários e secundários (traduzida) (Herrmann, 1995).

2.3. Importância

O ácido fólico e os folatos são vitaminas essenciais, que possuem um papel chave nas reações de transferência de carbono, que ocorrem na biossíntese de DNA, como doador e receptor dos grupos C1, e no ciclo da metilação (Katzung, 1994; Devlin, 1997; Blount et al, 1997; Scott, Rébeille e Fletcher, 2000; Trumbo 2003).

Vários tipos de folatos são necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo, estando envolvidos na síntese de purina, timidilato (dTMP), síntese de colina, serina e glicina, (Wagner, 1995). A participação de folatos na síntese de purina de

dTMP parece ser, destas reações, a metabolicamente mais significativa, por ser fundamental à síntese de DNA (Katzung, 1994; Dang, Arcot e Shrestha, 2000; Thomas, Flanagan e Pawlosky, 2003).

A deficiência da vitamina está sendo apontada como a principal responsável pela incidência de malformações congênitas (Milunsky, Jick e Jick, 1989; Shaw, Schaffer e Velie, 1995), os chamados defeitos do tubo neural (Gregory, 2001; Evans et al., 2004), que se produzem como consequência de alterações em sua configuração física durante a primeira etapa da gestação, e podem atingir dois níveis, no cérebro (podendo dar lugar a anencefalia ou a um encefalocele), ou na coluna vertebral (espinha bífida) (Cabrera et al., 2004; Ramaekers e Blau, 2004), pois no período de gestação ocorre aumento do número de células em divisão rápida, havendo então, maior necessidade do consumo da vitamina desde os primeiros dias de gestação (Carmichael et al., 2003). Segundo Bjorklund e Gordon, (2006), além das deficiências coronárias, os defeitos no tubo neural são as deficiências de malformação mais comuns em todo o mundo.

O tubo neural é formado entre os dias 21-27 após a concepção, antes de muitas mulheres perceberem que estão grávidas. Afim de prevenir os defeitos do tubo neural, a mulheres devem consumir folatos em quantidades adequadas desde a fase antes da concepção até 12 semanas de gestação (revisado em Storozhenko et al., 2005). Segundo Carmichael et al. (2003) e Paz e Hernández-Navarro (2006), mulheres grávidas podem tornar-se deficientes, especialmente se suas dietas oferecem quantidades marginais dessa vitamina.

Os folatos também participam na produção normal das hemáceas e a carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta, pode levar à anemia megaloblástica (Dierkes, Kroesen e Pietrzik, 1998; Gregory III, 1989; Scott, 2000; Asok, 2005; Paz e Navarro, 2006). Além disso, o 5-metiltetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína em metionina (Devlin, 1997; Paz e Navarro, 2006, Nilsson et al., 2008).

Doenças cardiovasculares representam a maior causa de morte em países ocidentais. No Brasil correspondem a 300 mil pessoas ao ano. Mais de 40% dos pacientes com doença primária da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica têm hiper-homocisteinemia (Gaull, Sturman e Schaffner, 1974; Nair, 2000). Há indícios de que essa possa ser a principal causa de risco de doenças coronárias e cardiovasculares (Seshadri et al., 2002)

A homocisteína vem alcançando grande importância como fator de risco para a doença arterial coronária (Welch e Loscalzo, 1998; Hankey e Eikelboom, 2000; Neto e Chagas, 2001; Rodrigo, Passalacqua e Araya, 2003; Schnabel, Lackner e Rupprecht, 2005), pois o alto nível de homocisteína no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes (Malinow, 1994; Scholl e Johnson, 2000; Willcox et al., 2003). Com o suplemento do folato ocorre diminuição dos níveis de homocisteína (Jacques, 1996; Moat, Lang e McDowell, 2004; Coppola, D'Ângelo, e Fermo, 2005; Caruso et al., 2006).

O ácido fólico é um importante co-fator na metilação da homocisteína que reduz a hiperhomocisteína. O nível sérico de folatos tem associação inversa com a homocisteína tanto em indivíduos saudáveis como em doentes, e é o único tratamento efetivo para reduzir a homocisteína em saudáveis, juntamente com a correção da deficiência da vitamina B12 (Neves, Macedo e Lopes, 2004)

A deficiência de folatos no organismo, ainda pode ser a causa de diversos tipos de câncer (Jägerstad, Jastrebova e Svensson, 2004), como colorectal (Lemos, 2007), mamas, pâncreas, brônquios e cervical, assim como leucemia (revisado em Lucock et al., 2003), e está relacionada a doenças crônicas como mal de Alzheimer e depressão (Jacques et al., 1999; Alpert et al., 2000).

Os estudos demonstram que cada uma das diferentes formas de folatos que são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano, desempenha um papel específico no metabolismo intracelular (Goodman e Gilman, 1991). A Tabela 2 apresenta algumas destas funções.

Tabela 2: Nomenclatura e funções bioquímicas das diversas formas de folatos.

Composto	Congênera	Radical	Posição	Função
Metiltetraidrofolato	CH ₃ H ₄ PteGlu	-CH ₃	N5	Conversão de homocisteína a metionina e de serina a glicina.
Ácido Fólico	5-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N5	Síntese de Purinas
10-Formiltetraidrofolato	10-CHOH ₄ PteGlu	-CHO	N10	Síntese de Purina. Utilização ou geração de formato
5,10-Meteniltetraidrofolato	5,10-CHH ₄ PteGlu	-CH-	N5-10	Síntese de Purina
5,10-Metilenotetraidrofolato	5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu	-CH ₂ -	N5-10	Síntese de timidilato
Formiminotetraidrofolato	CHNHH ₄ PteGlu	-CHNH	N5	Metabolismo da histidina

Fonte: (Katzung, 1994; Zanni e Oga, 1994; Daly et al., 1997).

Pesquisas mais recentes demonstram o potencial antioxidante das formas fisiológicas dos folatos (Stocker et al., 2003; Gliszczyńska-Swigło, 2007), inclusive do ácido fólico, forma utilizada na suplementação das mais variadas formas de alimentos (Gliszczyńska-Swigło, 2007).

2.4. Fontes

Segundo a ANVISA (2005), são recomendados 240µg diários de folatos para homens e mulheres adultos.

As principais fontes de folatos são os cogumelos, rim, fígado, leveduras e especialmente vegetais (Brody, 1991; Franco, 1992, Quirós et al., 2004), como brócolis, tomate e espinafre (Lima, 2005). Em menores quantidades os folatos também são encontrados em carnes, cereais, frutas e em algumas raízes (Quirós et al., 2004). Ainda segundo The National Findiet, 2002 Study (2003), os cereais, principalmente os produtos de grãos inteiros, são os maiores contribuidores de folatos na dieta.

Algumas técnicas no processamento de alimentos podem aumentar as concentrações de folatos, como os bioprocessos, incluindo fermentação (Seyoum e Selhub, 1998; Osseyi, Ewhling e Albrecht, 2001; Kariluoto et al., 2004). Vinho, cerveja e pães, são exemplos de alimentos produzidos através da fermentação por leveduras, por si mesma, uma rica fonte de folatos (Seyoum e Selhub, 1998). Kariluoto, et. al. (2006) descreve que a habilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produzir folatos em meios específicos para o crescimento dos microorganismos é maior que outros tipos de levedura e bactérias. A quantidade de vitamina encontrada na biomassa celular é 40 vezes maior que a quantidade da vitamina excretada no meio pela levedura (Kariluoto, et. al., 2006), fato que confirma que não só o alimento produzido pela levedura contém folatos, mas também a próprio microorganismo.

Folatos são encontrados tanto em produtos de bioprocessos como produtos derivados da fermentação de produtos lácteos e produtos de panificação (Osseyi, Ewhling e Albrecht, 2001), mostrando que as leveduras, mesmo em processos de transformação de alguns tipos de produtos de origem animal e vegetal, mantém e/ou aumentam a quantidade de folatos originalmente presente nesses alimentos (Kariluoto et al., 2004). No estudo de Jägerstad et al. (2005), pães, leite e vegetais fermentados tiveram um aumento

na concentração de folatos de no mínimo 100%. Esses dados corroboram com o conhecimento de que as leveduras são fonte desta vitamina (Brody, 1991).

Segundo Jägerstad et al. (2005) o nível de folatos em cereais não malteados está entre 0,5 e 1,0 mg/Kg, mas durante o processo de malteação da cevada, estes níveis podem dobrar ou triplicar, particularmente durante os dois primeiros dias de germinação. Em uma pesquisa realizada por estes autores com 120 cervejas americanas foram encontrados folatos em uma concentração entre 3 e 18 µg/100mL, e os mesmos afirmam que para aqueles que consomem cervejas regularmente, a ingestão de folatos através da bebida pode estar entre 10-20% das necessidades diárias. Ainda, segundo Catharino (2004), amostras de cerveja Pilsen brasileiras apresentaram teor de folatos total numa faixa de 293 a 653 µg/100mL, sendo considerada excelente fonte dessa vitamina.

2.5. Biodisponibilidade

Sabe-se que o consumo excessivo de álcool resulta em prejuízo da biodisponibilidade de folatos no organismo (Halsted et al., 1971; Russell et al., 1983; Manari et al., 2003; Mason e Choi, 2005), embora os consumidores de mais de 100 g de álcool por dia geralmente possuam deficiência dos níveis recomendados de ingestão de muitos micronutrientes, a inadequação do folato está entre as mais comuns e está presente em praticamente todos os membros deste grupo (Manari et al., 2003).

No entanto, provavelmente este fato não ocorre entre os consumidores moderados de álcool. Estudos de populações cujo consumo médio se situa entre uma e duas bebidas por dia, geralmente não observam baixa de folato no organismo (Jiang et al., 2003; Planells et al., 2003; Mason e Choi, 2005). Mayer et al. (2001), estudou consumidores de cerveja e percebeu relação positiva entre a cerveja, o ácido fólico e concentrações de vitamina B12 no sangue, e negativas com a concentração de homocisteína. Por categorias do consumo de cerveja, os indivíduos com ingestão de 1 litro por dia possuíam significativamente menos concentração de homocisteína no sangue e maiores concentrações de folato que os indivíduos com menor consumo de cerveja diário. Os autores concluíram ainda, que o consumo moderado de cerveja pode ajudar a manter os níveis de homocisteína na faixa normal devido ao alto teor de folato presente na bebida, e que a cerveja pode contribuir para o efeito protetor do álcool sobre as doenças cardiovasculares na população em geral com baixa ingestão de folato de outros alimentos.

3. Compostos antioxidantes

3.1. Importância

Antioxidantes são inúmeras substâncias orgânicas, como a vitamina E ou o betacaroteno, que são capazes de contrariar os efeitos prejudiciais da oxidação em tecidos animais. São compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (Krinsky, 1994). Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para a determinação da capacidade antioxidante (Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2006; Freitas, 2006).

Uma substância é considerada antioxidante quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997; Halliwell, 2002). Também podem ser definidos como compostos, naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que têm propriedade de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Moreira e Mancini-Filho, 2003).

Estudos epidemiológicos associaram o uso de suplementos de compostos antioxidantes, incluindo compostos polifenólicos, vitaminas E e C, e carotenóides, com redução substancial do risco de doenças relacionadas com estresse oxidativo (Ames, Gold e Willet, 1995), um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, com balanço maior para as oxidantes, resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres (Sies, 1993).

Entre as doenças que possuem risco reduzido pela ingestão de compostos antioxidantes encontram-se o câncer e insuficiência coronária (Sies, 1991; Gey e Puska, 1989; Gerster, 1991; Namiki, 1990; Ramarathnam et al., 1995; Willet, 2001; Papadopoulou e Frazier, 2004), inflamação e doenças relacionadas ao envelhecimento (Willet, 2001) esclerose múltipla, mal de Parkinson, isquemia, anemia e demência senil (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Os compostos antioxidantes desempenham a função de neutralizar os efeitos oxidantes em lipídios através de reação com radicais livres altamente reativos, os principais fatores para a modificação oxidativa de lipoproteínas e ácidos nucleicos de baixa densidade. Este mecanismo de ação dos antioxidantes possui um papel importante

na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento destas patologias (Namiki, 1990; Ramarathnam et al., 1995).

De todo o oxigênio disponível para célula, 95% se transforma em energia e 5% se transforma em espécies reativas de oxigênio (Davies, 1994). As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (Frémont, 2000). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Lo e Cheung, 2005).

As espécies reativas do oxigênio (ERO's) formam as espécies radicalares cujo elétron desemparelhado está localizado no átomo de oxigênio (Figura 6). São exemplos de ERO's o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o radical peroxila ($RO_2^{\bullet}$) (Berger, 2005).

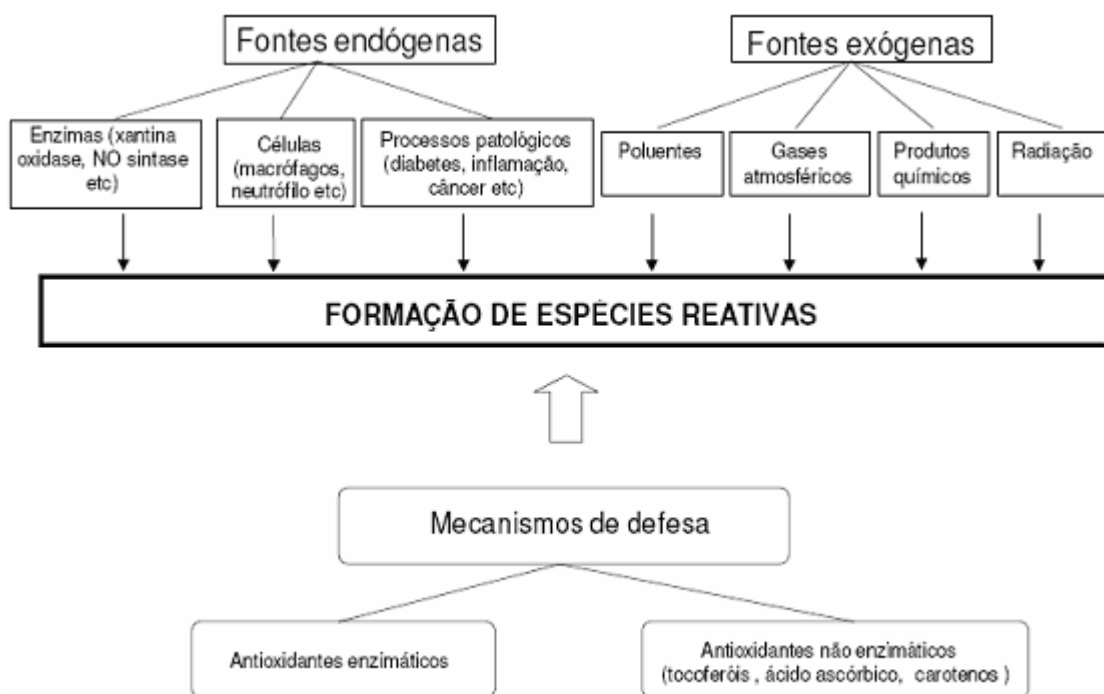


Figura 6: Algumas fontes de EROs e mecanismos de defesa. (Bioquímica, 2005 in: Freitas, 2006).

Em organismos aeróbios saudáveis o balanço entre a formação de ERO's com a produção de antioxidantes, deve estar em equilíbrio. Quando a geração de ERO's sobrepassa as barreiras de defesa do organismo, se inicia a produção de um grande número de danos oxidativos nas estruturas biológicas de macromoléculas tais como DNA, carboidratos, proteínas e lipídios (Gonzales San José, Muniz Rodrigues e Vall Bellés, 2001).

3.2. Classes

Angelo e Jorge (2007) indicam que os antioxidantes podem ser divididos em duas classes, sendo formados por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sangüínea) como nos alimentos ingeridos (Montero, 1996). Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas - superóxido-dismutase, glutathiona-peroxidase e catalases. Várias enzimas antioxidantes são metaloenzimas, que contêm traços de minerais. A glutathiona-peroxidase é uma enzima dependente de selênio, e a enzima superóxido-dismutase contém manganês, zinco ou cobre, dependendo da sua localização nos compartimentos celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína) e compostos fenólicos (Moreira e Mancini-Filho, 2004) como bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (Papadopoulos, 1999).

De acordo com seu modo de ação, podem ser classificados como primários ou secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (Adegoke e al, 1998).

3.3. Principais Antioxidantes Naturais em Alimentos

Campos et al. (2008) em sua revisão, indicam os compostos antioxidantes relacionados abaixo:

3.4.1. *Vitamina C*

O termo vitamina C é uma denominação genérica para todos os compostos que apresentam atividade biológica do ácido ascórbico. Dentre eles, o ácido ascórbico é o mais largamente encontrado nos alimentos e possui maior poder antioxidante (Stahl e Sies, 1997). É amplamente encontrada em frutas e vegetais na forma de ácido ascórbico ou na forma oxidada, ácido dehidroascórbico.

3.4.2. *Vitamina E*

A vitamina E é uma substância lipossolúvel e existente na natureza como tocoferóis e tocotrienóis, em quatro formas diferentes (α , β , γ e δ), sendo o α -tocoferol a forma antioxidante mais ativa e amplamente distribuída nos tecidos e no plasma (Niki, 1996). O *Institute of Medicine*, USA, revisou a atividade biológica desses compostos e concluiu que apenas ao α -tocoferol pode ser atribuída atividade vitamínica (United State National Academy of Sciences, 2000).

3.4.3. *Carotenóides*

Os carotenóides são corantes naturais presentes nas frutas e vegetais (cenouras, tomates, espinafre, laranjas, pêssegos, entre outros). São compostos lipofílicos e podem ser divididos em dois grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos, cíclicos ou não, e as xantofilas, que são derivados oxigenados (Britton, 1992). Dos cerca de 600 carotenóides identificados, somente alguns são encontrados em tecidos humanos, dentre eles estão o licopeno e β -caroteno, e as xantofilas, luteína e zeaxantina. Alguns carotenóides, como α e β -caroteno e β -criptoxantina, podem ser convertidos a vitamina A após sua ingestão, exercendo papel importante nos processos de visão, diferenciação celular e imunidade (Olson, 1991).

3.4.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários (Harborne, 2003; Naczki e Shahidi, 2004), que incluem diferentes categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Sousa et al., 2007).

Caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (Carpes, 2008).

Os flavonóides formam o grupo de maior importância dentre os compostos fenólicos, com cerca de 4000 compostos identificados (Hollman e Katan, 1999) que ainda podem ser subdivididos em sub-classes, como: antocianidinas, flavonóis, catequinas e isoflavonas. Os flavonóides podem ser encontrados amplamente em vegetais, com grande variação em seu conteúdo total e distribuição qualitativa (Chu et al., 2000).

Entre as possíveis ações dos flavonóides no organismo humano destacam-se a inibição da proliferação de células cancerígenas e efeitos antiinflamatórios e antiateroscleróticos. Agem como seqüestrantes de ânions superóxido e outros compostos reativos, formando compostos menos reativos (Nijveldt, 2001).

A capacidade antioxidante destes compostos é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, reduzindo radicais livres reativos, como o oxigênio “singlet” ou decompondo peróxidos e produzindo o radical fenoxila, menos reativo; assim como da presença de elétrons doadores no anel estrutural (Miller, 1997). Eles podem agir tanto na fase lipídica como em fase aquosa (Nijveldt, 2001).

Os polifenóis são substâncias fenólicas solúveis em água que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (Santos e Mello, 2000), são efetivos doadores de hidrogênio, particularmente os flavonóis.

3.4. Fontes

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de ervas como alecrim

(Ramalho, 2005), coentro (Melo et al., 2003), sálvia (Lu e Foo, 2001), tomilho, manjerição (Lee et al., 2005) e erva-mate (Furlong et al., 2003) têm sido estudados devido ao poder antioxidante.

As hortaliças são fontes importantes de diversos compostos antioxidantes como vitamina C, compostos fenólicos, vitamina E e carotenóides. Esta é uma das razões pelas quais o consumo de frutas e hortaliças vem sendo continuamente incentivado. As hortaliças folhosas verdes escuras, seguidas das cenouras e abóboras, são as principais fontes alimentares de carotenóides (Rodrigués-Amaya, 1997). O azeite extra-virgem (Galli e Visioli, 1999) e alguns tipos de pimentas (Bandyopadhyay, Narayan e Variyar, 1990; Pradhan et al., 1999) também possuem capacidade antioxidante; assim como o chimarrão (bebida produzida através da erva-mate) (Meinhart et al., 2010).

Quanto aos polifenóis, as principais fontes são as frutas e bebidas (sucos de frutas, vinho, chá, café, chocolate e cerveja) verduras, legumes e cereais (Freitas, 2006).

Os polifenóis da cerveja são essencialmente provenientes da casca de cevada malteada e do lúpulo. Também aparecem compostos mais complexos como os taninos, sendo os mais importantes as proantocianidinas de diversos graus de polimerização (González San José, Muniz Rodrigues e Vall Bellés, 2001; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002).

4. Qualidade da cerveja

O sabor da cerveja é o resultado de uma interação complexa entre centenas de compostos químicos e os receptores humanos de gosto e aroma. Entretanto, alguns compostos promovem muitas reações químicas durante o armazenamento da bebida, tendo por consequência uma diminuição de notas frescas.

Esta falta de estabilidade do sabor é uma das grandes preocupações dos fabricantes de cerveja, já que é fundamental que uma cerveja comercial seja consistente e satisfaça as expectativas do consumidor a cada consumo, sem sabor de envelhecido. Assim, tem sido objeto de forte investigação a procura por identificar os compostos que são preponderantes na estabilidade organoléptica da cerveja e os compostos que resultam do processo de envelhecimento responsáveis pelas alterações organolépticas detectadas na cerveja envelhecida (Santos, 2002, Saison et al., 2009).

Como resultado desse esforço de investigação já foram caracterizados vários fatores associados à fabricação e armazenamento da cerveja que influenciam de forma

notória a qualidade e estabilidade deste produto (Santos, 2002). Neste contexto, surgem como exemplos de fatores relevantes a seleção adequada de matérias primas (Bamforth, 2000; Drost, 1990) e o controle sobre o nível de oxigênio presente durante a fabricação e envelhecimento da cerveja (Bamforth, 2000; Meilgaard, 1970). Vários estudos têm apontado o oxigênio como sendo o principal agente responsável pela degradação das características organolépticas da cerveja assim como as condições de seu armazenamento (Hill, 1999). O condicionamento da cerveja a temperaturas baixas atrasa todos os fenômenos associados ao seu envelhecimento, e a proteção da cerveja da luz natural evita a ocorrência de fenômenos de foto-oxidação, associados ao desenvolvimento de aromas / gostos desagradáveis.

O conjunto de transformações organolépticas que ocorrem ao longo do envelhecimento da cerveja está inevitavelmente associado a alterações da concentração de compostos que influem sobre o sabor / aroma da cerveja. O desenvolvimento de novas técnicas e novos métodos de análise tem contribuído para a identificação destes compostos (Scherer et al., 2009) e dos equilíbrios em que participam (Santos, 2002).

4.1. Sabor envelhecido x trans-2-nonenal

Os índices excessivos de ar e/ou as altas temperaturas e os tempos durante a pasteurização podem conduzir ao gosto de pasteurizado. A cerveja exposta à luz adquire um sabor desagradável. Em algum momento (semanas) após o processo de pasteurização, o gosto da oxidação aparece, e a seguir, surge o sabor de “velho” e papelão (Drost et al., 1990; Santos et al., 2003). Atualmente, o gosto da pasteurização e da oxidação é raramente percebido por efeito de técnicas de enchimento e pasteurização melhoradas, entretanto, os fenômenos dos sabores de papelão e “velho” podem ser encontrados (Drost et al., 1990).

Para o sabor de papelão característico na cerveja envelhecida, os mecanismos de produção ainda não são esclarecidos. Este “off-flavor” foi citado primeiramente nos anos 50, especialmente nos Estados Unidos por Hamburguer (Burger, Glenister e Becker, 1954) e nos Países Baixos, e é detectado principalmente em cervejas do tipo “Lager”. Este tipo de cerveja é produzido a partir de maltes mais claros, e, frequentemente, utilizando adjuntos. Embora estas cervejas tenham um bom caimento e um sabor delicado, são mais suscetíveis aos “off-flavors” (Meilgaard, 1975).

Alguns aldeídos, em determinadas concentrações, podem gerar sabor agradável, entretanto altos níveis são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor oxidado. (Yasuara, Kawada e Shibamoto, 1998). A liberação ou formação de compostos carbonílicos em cerveja já envasada, especialmente os compostos contendo 7 a 10 átomos de carbono (com baixo limiar de detecção), contribui para o sabor de envelhecido. Outros termos de descrição do sabor oxidado ou “velho” são: papelão, couro, bolor, deteriorado e agressivo (Mattos, 2007).

Neste contexto, um dos compostos mais citados com o aumento da concentração devido à oxidação da cerveja é o trans-2-nonenal (Figura 7) (Meilgaard, 1975; Liegeois et al., 2002; Santos et al., 2003, Saison et al., 2009), que pode fazer-se notar logo a partir do primeiro mês de envelhecimento da bebida.

A identificação do aldeído trans-2-nonenal na cerveja surgiu em 1970 por Jamieson e Van Gheluwe. Estes investigadores foram os primeiros a correlacionar o aroma e sabor a papel-cartão que ocorre em cerveja envelhecida, com a presença deste aldeído. Em 1974, Wang e Siebert demonstraram que não é necessária a participação sinérgica dos outros compostos para, juntamente com o aldeído trans-2-nonenal, se sentir o sabor a papel-cartão. Segundo estes mesmos autores, uma concentração deste aldeído compreendida entre 0,05 ppb e 0,1 ppb é suficiente para fazer sobressair este sabor característico. Para concentrações próximas de 0,2 ppb são perceptíveis notas desagradáveis a papel, papel moído e cartão, e para concentrações ainda mais elevadas deste aldeído é perceptível um aroma a pepino (Collin e Noël, 1994).

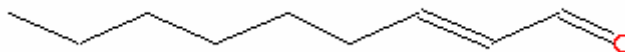


Figura 7: Estrutura química do Trans-2-nonenal (software Class 5000)

Os principais mecanismos contribuintes responsáveis pela geração do trans-2-nonenal são as oxidações enzimáticas e não enzimáticas dos lipídios (Drost et al., 1990).

Guyot-Declerck et al. (2005) colocam que o teor de trans-2-nonenal, metional e dimetil-sulfeto aumentam conforme a cerveja envelhece, além de ter boa correlação com a análise sensorial descritiva feita por provadores treinados. O pH da cerveja, que normalmente se encontra em torno de 4,0 ou 4,5 tem influência sobre a formação do trans-2-nonenal durante o envelhecimento (Guyot-Declerck et al., 2005).

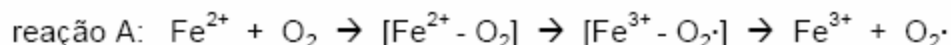
4.2. Vias de produção do trans-2-nonenal

Segundo Mattos (2007), as vias em que o trans-2-nonenal é produzido não são ainda muito claras. Alguns autores mencionam que ele é formado com constituintes da cerveja como o SO₂ (Nyborg, Outtrup e Dreyer, 1999 e Gracey et al., 1984) e aminoácidos (Lermusieau, 1999). A presença de dióxido de enxofre em cerveja é um fator com alta influência no sabor de envelhecimento. Sabe-se que sua concentração gradualmente decresce durante a estocagem, e isto ocorre porque o dióxido de enxofre protege a cerveja contra a oxidação, além disso, tem outro papel importante na bebida que é formar adutos com compostos carbonílicos, aumentando seu “threshold” (Santos et al., 2003).

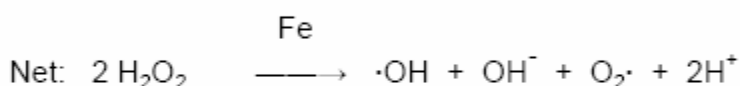
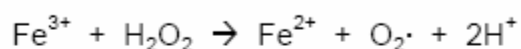
Outros autores apontam que o crescimento do teor de trans-2-nonenal deve ser essencialmente através de sua formação pelos precursores. Neste contexto, muitas hipóteses podem ser encontradas na literatura: degradação de Strecker (Walters, 1997), degradação oxidativa de iso-humulonas (Hashimoto e Eshima, 1977), oxidação de ácidos graxos (Drost et al., 1990 e Bamforth, 2000) ou condensação aldólica (Wackerbauer e Hardt, 1997). Bamforth (2000), Narziss (1986) e Hashimoto (1981) colocam os compostos carbonílicos como provenientes de algumas das reações químicas citadas e da degradação de iso-alfa-ácidos, oxidação de álcoois superiores intermediada por melanoidinas e degradação enzimática de lipídios. Bamforth (2000) mostrou que a ocorrência mínima dessas reações é suficiente para a formação de baixíssimas quantidades desses compostos carbonílicos, já acima de seus limiares de detecção, alterando o sabor da cerveja.

Kaneda et al. (1988; 1990) e Uchida et al. (1996), evidenciaram a presença de radicais livres no processo de oxidação da cerveja. Kaneda et al. (1999) propuseram uma seqüência de reações para a oxidação da cerveja durante a estocagem (Figura 8). Inicialmente o oxigênio triplete (³O₂) seria convertido pela ação da luz, calor ou catálise por metais, em oxigênio singlete (¹O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou radicais superóxido (O₂⁻) ou hidroperóxido (●OOH), que são as chamadas "espécies reativas de oxigênio" (ERO). Em reações catalisadas por metais como ferro (Reações de Fenton) e cobre (Reações de Haber-Weiss) o H₂O₂ e o O₂⁻ são transformados em radicais hidroxila (●OH), que é uma ERO ainda mais reativa. São esses radicais que reagem com os componentes da cerveja, como polifenóis, álcoois, ácidos graxos, açúcares e iso-humulonas levando à formação das carbonilas responsáveis pelo sabor oxidado. Os

radicais fornecem energia química para as reações químicas de formação dos compostos carbonílicos (Mattos, 2007).



reação B: reação de Fenton



reação C: reação de Haber-Weiss catalisada por Ferro

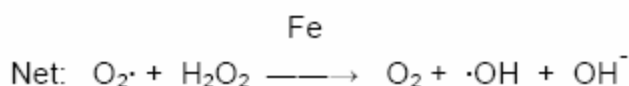
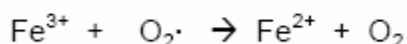


Figura 8: Esquema da formação dos radicais livres responsáveis pelas reações de oxidação dos compostos da cerveja (Kaneda et al., 1999).

Os danos causados ao sabor da cerveja pela formação destes compostos nas fases do processo de produção anteriores ao envasamento, apesar de citados como importantes por alguns autores (Narziss et al., 1986 e 1993; Drost et al., 1990; Maeda, 1999; Noël et al., 1999; Liegeois, 1999), são considerados desprezíveis se comparados aos danos causados pela formação dos mesmos durante a estocagem (Figura 9) (Bamforth, 2000 e 2004; Meilgaard, 2001). Isso se deve à ação redutora da levedura e à produção de SO_2 durante a fermentação.

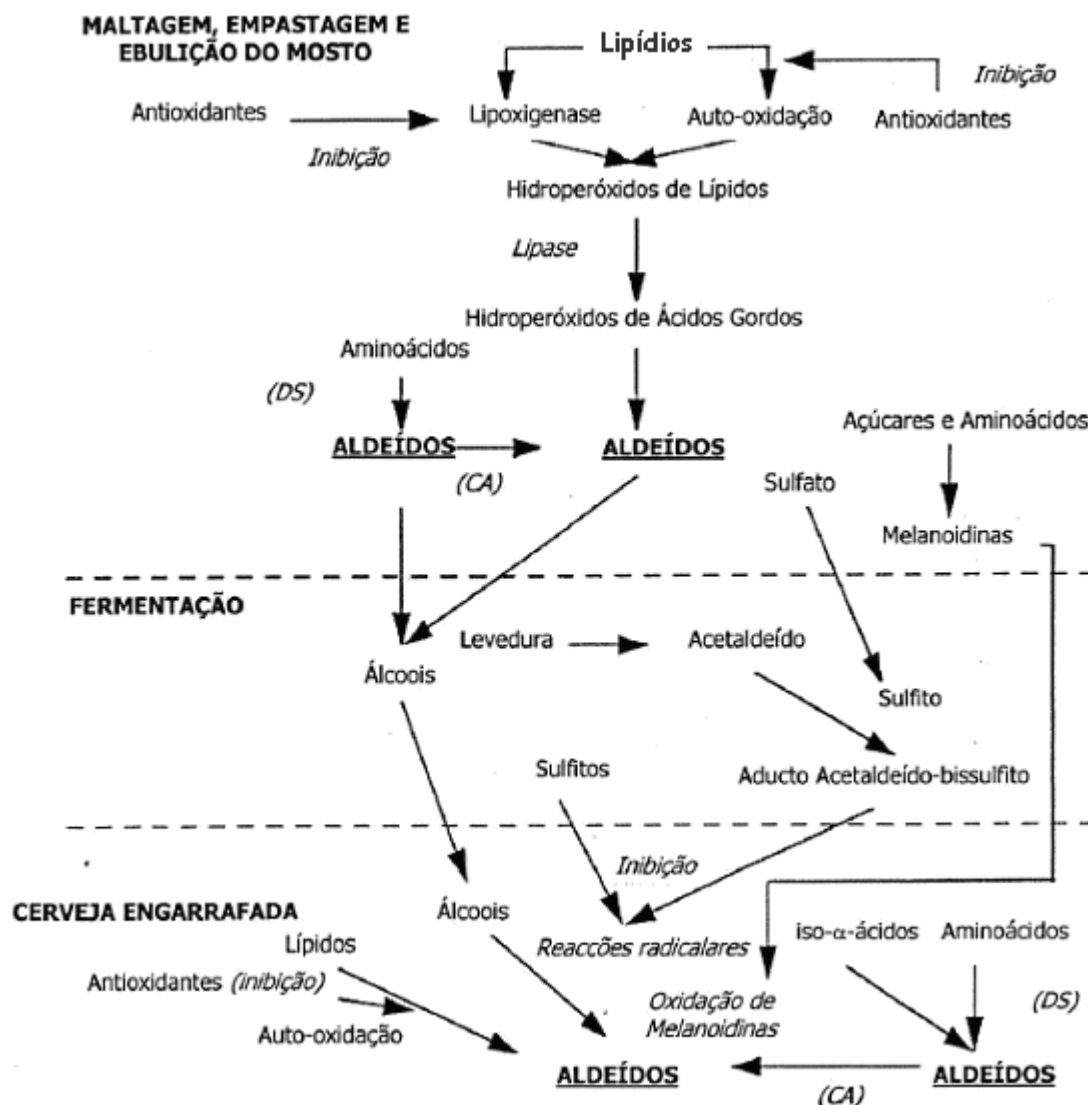


Figura 9: Diagrama esquemático ilustrativo da formação de aldeídos durante a fabricação e envelhecimento da cerveja (Walters, 1997). DS: Degradação de Strecker e CA: Condensação Aldólica.

5. Referências Bibliográficas

ADEGOKE G. O, VIJAY KUMAR M, GOPALA KRISHNA A. G, VARADARAJ M. C, SAMBAIAH K, LOKESH B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of food science and technology**, v.35, n.4, p.283-398. 1998

ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.544-546, 2000.

ANGELO P M., JORGE N., Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Rev. **Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br > acesso em 15 set 2009.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.5258-5265. 1995

ASOK C. A., **Megaloblastic anemias**. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology. Basic Principles and Practice. 2 ed.. Nova York: Churchill Livingstone, 2005, p.519-556.

BANDYOPADHYAY, C., NARAYAN, V. S., VARIYAR, P. S. Phenolics of green pepper berries (*Piper nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1696–1699. 1990.

BAMFORTH, C. W. Making sense of flavor change in beer. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.37, n.2, p.165-171, 2000.

BAMFORTH, C. W. A critical control point analysis for flavor stability of beer. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.41, n.2, p.97-103, 2004.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.24, p.172-183, 2005.

BIOQUÍMICA. Departamento de bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. SP. 2005. 149p.

BLOUNT B. C., MACK M. M., WEHR C. M., MACGREGOR J. T., HIATT R. A., WANG G., WICKRAMASINGHE S. N., EVERSON R. B., AMES B. N.; Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.**, v.94, p.3290-3295. 1997.

BJORKLUND N. K., GORDON R., A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. **International Journal of Developmental Biology**, v.50, p.135-141. 2006.

BRACCO, A. Cerveja um brinde ao verão. **Alimentos & Tecnologia**, n.7, 1986.

BRASIL. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1997.

de BREE, A., Van DUSSELDORP, M., BROUWER, I. A., Van Het HOF, K. H., STEEGERSTHEUNISSEN, R. P. M., Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.643-660, 1997.

BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G. F. (Ed.) **Natural foods colorants**. New York: Blackie, 1992. p.141-182.

BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L. J. **Handbook of Vitamins**. 2 ed Rev. and Expanded, New York: Marcel Decker, 1991, p. 453-490.

BROUWER V, STOROZHENKO S., VAN DE STEENE J. C., WILLE S. M. R., STOVE C. P., VAN DER STRAETEN D., LAMBERT W. E., Optimisation and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for folates in rice. **Journal of Chromatography A**, v.1215, n.1-2, p.125-132, 2008.

BURGER, M., GLENISTER, P. R., AND BECKER, K. Acrolein and other aldehydes in beer. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, p.98-107, 1954.

CABRERA, R. M., HILL, D. S., ETHEREDGE, A. J., FINNELL, R.H., Investigations into the etiology of neural tube defects. **Birth Defects Research. Embryo Today Reviews**, v.72, n.4, p.330-344, 2004.

CAMPOS F. M., MARTINO H. S. D., SABARENSE C. M., PINHEIRO-SANTANA H. M.; Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.

CARPES, S. T., **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de apis mellifera L. da região sul do Brasil**, 2008, 245p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2008.

CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Folatos em Alimentos**, 2004, 96p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.

CARUSO, R., CAMPOLO, J., SEDDA V., DE CHIARA, B., DELLANOCE, C., BAUDO, F., TONINI, A., PAROLINI, M., CIGHETTI G., PARODI, O., Effect of homocysteine lowering by 5- methyltetrahydrofolate on redox status in hyperhomocysteinemia, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.47, n.4, p.549-555, 2006.

CHARLES P., LAITINEN K., KARDINAAL A., Alcohol and Bone. In **Health Issues Related to Alcohol Consumption**, second edition. Edited by Ian MacDonald, Blackwell Science Ltd. 1999.

CHU, Y. H.; CHANG, C. L.; HSU, H. F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.5, p.561-566, 2000.

COLLIN, S., NOËL, S., Reactions Chimiques et Enzymatiques Productrices d'arômes au Brassage, **Cerevisia and biotechnology**, v.19, p.25-32. 1994.

COPPOLA, A., D'ANGELO, A., FERMO, I., Reduced em vivo oxidative stress following 5-methyltetrahydrofolate supplementation in patients with early-onset thrombosis and 677TT methyltetrahydrofolate reductase genotype. **British Journal of Haematology**, v.131, p.100-108, 2005.

CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by perioconceptional vitamin supplementation. **The New England Journal of Medicine**, v.327, n.226, p.1832-1835, 1992.

DALY, S; MILLS, J. R; MOLLOY, A. M; CONLEY, M; LEE, Y. J; KIRKE P. N; WEIR, D. G; SCOTT, J. M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **The Lancet**, v.350, n.9092, p.1666-1669, 1997.

DANG, J.; ARCOT J.; SHRESTHA, A. Folate retention in select processed legumes. **Food Chemistry**, v.68, n.3, p.295-298, 2000.

DATAMARK. Mercado de cerveja cresce mesmo no inverno e com crise. <http://www.justi2inews.com/conteudo/justi2i_news_conteudo_p.aspx?idn=27613> Acesso em: 11 nov 2009.

DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; SANMARTIM, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVEL, D.; FLETCHER, J.. Plant L-ascorbic acid: chemistry function metabolism bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p.825-860, 2000.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1997, 1007p.

DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.68, p.98-103, 1998.

DROST B. W., VAN DEN BERG R., FREIJEE F. J. M., VAN DER VELDE E. G., HOLLEMANS M., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.48, n.4, p.124-131. 1990.

EITTENMILLER, R.R., LANDEN Jr, W. O., AUGUSTIN, J., in: S.S. Nielsen (ed.), **Food Analysis**, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, cap18, 1998. 284 p.

EVANS, M. I., LLURBA, E., LANDSBERGER, E. J., OBRIEN, J. E., HARRISON, H. H., Impact of folic acid fortification in the United States: Markedly diminished high maternal serum alpha-feto-protein values. **Obstetrics & Gynecology**, v.103, p.474-479, 2004.

FAGRELL B., de FAIRE U., BONDY S. The effects of light to moderate drinking on cardiovascular diseases. **Journal of Internal Medicine**, v.246, p.331-340. 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FILHO, W. G. V., **Tecnologia de Cerveja**. 1ed. Jabotical: Funep, 2000, 83p.

FREITAS G. L., **Potencial Antioxidante e Compostos Fenólicos na Cerveja, Chopp, Cevada (*Hordeum Vulgare* L.) e no Bagaço de Brassagem**, 2006, Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos), Centro de Ciências Agrárias; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FURLONG E. B., COLLA E; BORTOLATO D. S., BAISCH A. L. M., SOUZA-SOARES L. A. S., Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*, Rio Grande, v.13, p.105-114, 2003.

GALGANO, F. The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli. **Journal of Food Science**, v.72, n.2, p.130-135, 2007.

GALLI, C., VISIOLI, F. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the mediterranean diet *Lipids*, v.34, p.23-26. 1999.

GAULL.G., STURMAN, J. A., SCHAFNER, F. Homocystinuria due to cystathionine β synthase deficiency: enzymatic and ultrastructural studies. **Journal of Pediatrics**, n.84, p.381-390, 1974.

GEY, K. F. PUSKA, P. Plasma vitamin E and A inversly correlated to mortality from ischemic heart disease in cross culture epidemiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.570, p.268-282. 1989.

GERSTER, H. Potential role of p-carotene in the prevention of cardiovascular disease. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.61, p.277-291. 1991.

GONZALEZ SAN JOSÉ, M. L.; MUNIZ RODRIGUEZ, P.; VALL BELLÉS, Y. V. Actividad antioxidante de la cerveza:estúdios in vitro e in vivo (1ª parte). **Cerveza y Salud**, v.154, p.47-54, 2001.

GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. Folate as antioxidants. **Food Chemistry**, v.101, p.1497-1500, 2007.

GORINSTEN S, ZEMSER M, LICHMAN I, Moderate beer consumption and the blood coagulation in patients with coronary heart disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 241, n.1, p.47-51.1997.

GRACEY D. E. F., BRAKER R. L., IRWIN A. J., PIPASTS P., LEIKA E. in: Clarke B. J. (Ed.), **Proceedings of the 18th convention of the institute of Brewing** (Australia and new Zealand Section), Adelaide, Australia, 1984. 50p.

GREEN J. M., Nichols BP, Matthews RG: **Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylation**. In *Escherichia coli and Salmonella – Cellular and Molecular Biology*. Edited by Neidhardt FC. Washington, DC: ASM Press; 1996, p. 665-673.

GREGORY, J. F., Case study: Folate bioavailability. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1376-1382, 2001.

GREGORY III, J.F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Advances in Food & Nutrition Research**, v.3, p.1-101, 1989.

GUYOT-DECLERCK, C.; FRANÇOIS, N.; RITTER, C.; GOVAERTS, B.; COLLIN S. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, Oxford, v.16, p.157-162, 2005.

HAIJ-ISA, N. M. A. **Estudo do uso de conservadores associados a tratamento térmico brando na preservação de cerveja à temperatura ambiente**, 2000, 146p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research**, v.9, p.1-32. 1990.

HALLIWELL, B. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. In: **Handbook of antioxidants**, 2. ed., Marcel Decker, USA: Enrique Cadenas e Lester Packer, 2002, p. 1-33.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical, other reactive species and disease. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Oxford: Clarenton Press. 1999, p.617-783.

HALSTED, C. H., ROBLES, E. A., MEZEY, E. Decreased jejunal uptake of labeled folic acid (3H-PGA) in alcoholic patients: roles of alcohol and nutrition. **New England Journal of Medicine**. v. 285, p. 701–706. 1971.

HANSON, A. D.; GREGORY, J. F., III Synthesis and turnover of folates in plants, **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.3, p.244-249, 2002.

HANKEY, G. J., EIKELBOOM, J. W., Homocysteine and vascular disease. **International Heart Journal**, v.52, p.518-526, 2000.

HASHIMOTO, T. ESHIMA, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.35, p.145, 1977.

HASHIMOTO, N. Flavour stability of packaged beer. In: POLLOCK, J.R.A. (Ed.). **Brewing Science**. London: Academic Press, v.2, p.365-405, 1981.

HASLAM, E. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites, Chichester: John Wiley and Sons, 1993.

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

HENDRIK H. F. J., RIMM E. B.; Moderate alcohol consumption increases plasma levels of a protective hormone. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. 2004.

HERRMANN, K. M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. **The Plant Cell**, v.7, p.907-919, 1995.

HILL, P., Six continents, one beer: the art of maintaining top beer quality all over the world, **Ferment**, p.22-24. 1999.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake health effects and bioavailability. **Food Chemistry Toxicology**, v.37, n.9-10, p.937-942, 1999.

HOUGH, J. S., **Biología de la cerveza y de la malta**. Tradução Gonzáles J. B., 1ed, Zaragoza: ACRIBIA, 1990. 194p.

JACQUES, P. F., Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, n.93, p.7-9, 1996.

JACQUES, P. F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **The New England Journal of Medicine**, v.340, n.19, p.1449-1454, 1999.

JÄGERSTAD, M., JASTREBOVA, J., SVENSSON, U., Foliates in fermented vegetables – A pilot study. **LWT- Food Science and Technology**, v.37, p.603-611, 2004.

JÄGERSTAD, M., PIIRONEN, V., WALKER, C., ROS, G., CARNOVALE, E., HOLASOVA, M., NAU, H., Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.298-306, 2005.

JAMIESON, A. M., and VAN GHELUWE, J. E. A. Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer. In **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, p.192-197. 1970.

JIANG, R., HU, F. B., GIOVANNUCCI, E. L., RIMM, E. B., STAMPFER, M. J., SPIEGELMAN, D., ROSNER, B. A., WILLETT, W. C. Joint association of alcohol and folate intake with risk of major chronic disease in women. **American Journal of Epidemiology**, v.158, p.760–771. 2003.

KANEDA, H, KANO, Y.; KAMIMURA, M.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. A research note - Detection of chemiluminescence produced during beer oxidation, v.55, n.3, p.881-882, 1990.

KANEDA, H; KOBAYASHI, N.; TAKASHIO, M.; TAMAKI, T.; SHINOTSUKA, K. Beer staling mechanism, v.36, n.1, p.41-47, 1999.

KARILUOTO, S., VAHTERISTO, L., SALOVAARA, H., KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., PIIRONEN, V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chemistry**, v.81, n.1, p.134-139, 2004.

KARILUOTO, S., AITTAMAA, M., KORHOLA, M., SALOVAARA, H., VAHTERISTO, L., PIIRONEN, V., Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.137-143, 2006.

KATZUNG B. G. **Farmacologia básica e clínica**, 5ed, São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, 1994. p.1003-1010.

LEE SJ, UMANO K, SHIBAMOTO T, LEE KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-137. 2005.

LEITZMANN M. F., GIOVANNUCCI E. L., STAMPFER M. J., Prospective study of alcohol consumption patterns in relation to symptomatic gallstone disease in men. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.23, n.5, p.835-841. 1999.

LEMOES C., PETERS G. J., JANSEN G., MARTEL F., CALHAU C.; Modulation of folate uptake in cultured human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by dietary compounds. **European Journal of Nutrition**, v.46, p.329–336, 2007

LERMUSIEAU G., NOEL S., LEIGEOIS C., COLLIN S., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.57 p.29,1999.

LIEGEOIS, C.; NOËL, S.; LERMUSIEAU, G.; COLLIN, S. A non-oxidative pathway for the synthesis of trans-2-nonenal during beer storage and transport. **Cerevisia**, v.24, n.3, p.21-27, 1999.

LIEGEOIS C, MEURENS N, BADOT C, COLLIN S. Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v.50, p.7634-7638, 2002

LIMA, J. A., **Folatos em Vegetais** – Influência do Tipo de Cultivo e do Processamento, 2005, 84p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2005.

LO, K. M.; CHEUNG, C. K. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. alba. **Food Chemistry**, v.89, p. 533-539, 2005.

LU Y, FOO LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v.75, n.2, p.197-202. 2001.

LUCOCK M. Z., YATES, Z., GLAVILLE, T., LEEMING, R., SIMPSON, N., DASKALAKIS, I., A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. **Nutrition Research**, v. 23, n.11, p.1463-1475, 2003.

MAEDA, K. Preventive production of beer against oxidation. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.36, n.1, p. 55-59, 1999.

MALINOW, M. R., Plasma homocystine and arterial occlusive diseases: a mini-review. **Clinical Chemistry**, v.40, p.173-176, 1994.

MANARI, A. P., PREEDY, V. R., PETERS, T. J. Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcoholics in the UK. **Addiction Biology**. v. 8, p. 201–210. 2003.

MATTOS, R. C. F., **Efeito das Variáveis de Transporte e Estocagem sobre a Estabilidade Sensorial de Cervejas Tipo Pilsen**. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2007.

MASON, J. B., CHOI, S-W., Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. **Alcohol** . v. 35, p.235–241, 2005.

MAYER, O. J., SIMON, J., ROSOLOVÁ H., A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 55, n.7, p.605-609, 2001.

MCCONNELL M. V., VAVOURANAKIS I., WU L. L., VAUGHN de, RIDKER P. M. Effects of a single daily alcoholic beverage on lipid and haemostatic markers of cardiovascular risk. **American Journal of Cardiology**, v.80, p.1226-1228. 1997.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.12, p.151-168, 1975.

MEILGAARD, M. C. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review, v.107, n.5, p.271-286, 2001.

MEILGAARD, M., ELIZONDO, A., MOYA, E., A study of carbonyl compounds in beer, Part II. flavor and flavor thresholds of aldehydes and ketones added to beer, **MBAA Technical Quarterly**, v.7, p.143-149. 1970.

MEINHART A. D. , BIZZOTTO C. S., BALLUS C. A. , RYBKA A. C. P., SOBRINHO M. R.,ROMINA SOFIA CERRO-QUINTANA R. S.,TEIXEIRA-FILHO J., GODOY H. T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages **J. Agric. Food Chem.** DOI:10.1021/jf903781w. ASAP. 2010.

MELO E. A, MANCINI-FILHO J., GUERRA N. B., MACIEL G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.195-199. 2003.

MILUNSKY A, JICK H, JICK SS, Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**; v.262, p.2847-2852, 1989.

MILLER, N.J.; RICES-EVAN, C.A. The relative contributions of ascorbic acid and pHenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.331-337, 1997,

MOAT, S. J., LANG, D., McDOWELL, I. F. W., Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.15, p.64-79, 2004.

MONTERO M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Anales de la Facultad de Medicina**, v.57, n.4. p.278-81. 1996.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em Sistemas Aquoso e Lipídico. Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição - **Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition**, v.25, p.44-45, 2003.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**; v.17, n.4, p.411-424. 2004.

NACZK M., SHAHIDI F. Extration abd anaylisis of pHenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.2, p.95-111, 2004.

NAIR. K. G., The genetic basis of hiperhomocysteinemia. **International Heart Journal**, n.52, p.516-517, 2000.

NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**; v.29, n.4, p.273-300. 1990.

NARZISS, L. Centenary review – Technological factors of flavour stability. **The Journal of the The Institute of Brewing**, v.92, n.4, p.346-353, 1986.

NARZISS, L.; MIEDANER, H.; GRAF, H.; EICHHORN, P.; LUSTIG, S. Technological approach to improve flavour stability. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.30, n.1, p.48-53, 1993.

NETO, J. R. F., CHAGAS, A. C. P., A homocisteína como fator de risco coronariano. **Atherosclerosis**, n.12, v.1, p.20-25, 2001.

NEVES, L. B., MACEDO, D. M., LOPES, A. C., Homocisteína. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v.40, n.5, p.311-320, 2004.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.V.; BOELEN, P.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p.418-425, 2001.

NIKI, E. α -Tocopherol. *In*: CADENAS, E., PACKER, L. (Ed.). **Handbook of antioxidants**. New York : Marcel Dekker,1996, p.3-25.

NILSSON K., GUSTAFSON L., FÄLDT R., ANDERSSON A., HULTBERG B.; Plasma homocysteine in relation to serum cobalamin and blood folate in a psychogeriatric population. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24, p.600 - 606, 2008.

NYBORG M., OUTTRUP H., DREYER T., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.57, p.24, 1999.

OLSON, J. A. Vitamin A. In: MACHLIN, L.J. (Ed.) **Handbook of vitamins**. 2nded. New York: Marcel Dekker, 1991, p.1-57.

OSSEYI, E. S., EWHLING, R. L., ALBRECHT, J. A., HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chemistry**, v.78, n.4, p.375-378, 2001.

PAPAS A. M. Diet and antioxidant status. **Food Chemistry Toxicology**, v.37, p.999-1007. 1999.

PAPADOPOULOU, A.; FRAZIER, R. A. Characterization of protein-polyphenol interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.186-190, 2004.

PAZ, R., HERNÁNDEZ-NAVARRO, F., Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico - Recomendaciones terapéuticas, **Nutrición Hospitalaria**, v.21, n.1, p.113-119, 2006.

PLANELLIS, E., SA´NCHEZ, C., MONTELLANO, M. A., MATAIX, J., LLOPIS, J. Vitamins B6 and B12 and folate status in an adult Mediterranean population. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.57, p.777–785. 2003

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

PRADHAN, K. J., VARIYAR, P. S., BANDEKAR, J. R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper berries (*Piper nigrum* L.). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 32, p.121–123. 1999.

QUIRÓS, A. R. B., RON, C. C. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J., LAGE-YUSTY, M. A., Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v.1032, p.135-139, 2005.

RAMAEKERS, V. T., BLAU, N., Cerebral folate deficiency. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v.46, n.12, p.843-851, 2004.

RAMALHO V. C. **Ação antioxidante de α -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação.** 2005. 154 p. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2005.

RAMARATHNAM N, OSAWA T, OCHI H, KAWAKISHI S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science & Technology** ; v.6, n.3, p.75-82. 1995.

REINOLD, M. R., **Manual Prático de Cervejaria.** 1ed. São Paulo: ADEN, 1997, 214p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids. **Free Radical Biology & Medicine** , v.7, p. 933-956, 1997.

RIMM E. B., STAMPFER M. J., COLDITZ G. A., WILLETT W. C. Prospective study of cigarette smoking, alcohol use, and the risk of diabetes in men. **British Medical Journal**, v. 310, p. 555-559. 1995.

RIMM E. B., WILLIAMS P., FOSHER K., CRIQUI M., STAMPFER M. J. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. **British Medical Journal**, v. 319, p.1523-1528. 1999.

RODRIGO, R., PASSALACQUA, W., ARAYA, J., Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 42, p. 453-461, 2003.

RODRIGUES, M. C. P. **Perfil sensorial e aceitação de cervejas comercializadas no mercado brasileiro – treinamento e monitoramento de julgadores**, 2001, 196p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Carotenoids and food preparation:** the retention of provitamin a carotenoids in prepared processed and stored foods. Washington, DC: OMNI, 1997, 88p.

RUSSELL, R. M., ROSENBERG, I. H., WILSON, P. D., IBER, F. L., OAKS, E. B., GIOVETTI, A. C., OTRADOVEC, C. L., KARWOSKI, P. A., PRESS, A. W. Increased urinary excretion and prolonged turnover time of folic acid during ethanol ingestion. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 38, p.64–70. 1983.

SAISON D., DE SCHUTTER D. P., UYTENHOVE B, DELVAUX F., DELVAUX F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v.114, p.1206-1215, 2009.

SANTOS J. R. S., **Determinação do *trans*-2-nonenal em Cerveja por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Espectrofotométrica**, 2002, 158p, Dissertação (Mestre em Química), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto 2002.

SANTOS J.R.; CARNEIRO J.R.; GUIDO L.F.; ALMEIDA P.J.; RODRIGUES J.A.; BARROS A.A.; Determination of *E*-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection Assay for the evaluation of beer ageing. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.395–402, 2003.

SCHERER R., WAGNER R., KOWALSKI C. H., GODOY, H. T., Method for (E)-2-nonenal analysis in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic coupled mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, aceito para publicação, 2009.

SCHNABEL, R., LACKNER, K. J., RUPPRECHT, H. J., Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction. **Journal of the American College of Cardiology**, v.45, p.1631-1637, 2005.

SCHOLL, T. O., JOHNSON, W. G., Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.5, p.1295-1303, 2000.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review; Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.795-824, 2000.

SESHADRI, S., BEISER, A., SELHUB, J., JACQUES, P. F., ROSENBERG, I. H., D'AGOSTINO R. B., Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, v.346, n.7, p.476-483, 2002.

SEYOUM, E., SELHUB, J., Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1956-1960, 1998.

SHAW G.M., SCHAFFER D., VELIE E.M., Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. **Epidemiology**, v.6, p.219-226, 1995.

- SIES, H. Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidant. **Academic Press**, London. 1991.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.
- SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br>> acesso em 19 jul 2009.
- SINDICERV, Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br>> acesso em 02 fev. 2010.
- SOUSA, C., SILVA H., VIEIRA-JR G., AYRES M., COSTA L., ARAÚJO D., CAVALCANTE L., BARROS E., ARAÚJO P., BRANDÃO M., CHAVES M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v. 46, n. 5, p.14-18,1997. Supplement 2.
- STAHL, W., SIES, H. Carotenoids: occurrence, biochemical activities, and bioavailability. *In*: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T. Antioxidant food supplements in human health. San Diego: **Academic Press**, p.183-98. 1999.
- STOROZHENKO S., RAVANEL, S., ZHANG, G. F., RÉBEILLÉ, F., LAMBERT, W., STRAETEN, D. V. D., Folate enhancement in staple crops by metabolic engeneering. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.271-281, 2005.
- STOCKER, P.; LESGARDS, J-F.; VIDAL, N.; CHALIER, F.; PROST, M.. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1621, p.1-8, 2003.
- THE NATIONAL FINDIET 2002 STUDY, *In*: Männistö, S., Ovaskainen, M. L., Valsta, L. (Eds), publications of the National Public Health institute B3/2003. Helsinki, Finland, 2003.
- THOMAS, P. M., FLANAGAN, V. P., PAWLOSKY, R. J., J Agric. **Food Chemistry**, v. 51, p.1293, 2003.
- TRUMBO, P. R. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamim and provitamim a carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.379-382, 2003.

UCHIDA, M.; ONO, M., Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.54, n.4, p.198-204, 1996.

UNITED STATE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. **Dietary intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington, 2000. cap.2, p. 35-57.

VARNAM A. H., SUTHERLAND J. P., **Beverages** – technology, chemistry and microbiology. v2. 1ed. London: Chapman & Hall, 1994, 464p.

VENTURINI FILHO, W. G., **Tecnologia de Cerveja**. 1ed. Jabotical: Funep, 2000. 83 p.

WACKERBAUER K., HARDT R., in: **Brauwelt International**, v. 4, 1997, 320 p.

WALTERS, M. T., Natural Antioxidants and Flavour Stability, **Journal of the The Institute of Brewing**, v.10, p.111-119. 1997.

WAGNER C., **Biochemical role of folate in cellular metabolism**. Bailey L. B. eds. Folate in Health and Disease, Nova York: Marcel Dekker, 1995.

WANG P. S., SIEBERT K. J., The influence of various storage conditions on the formation of 2-nonenal in bottled beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists** v.32, p.47-49, 1974.

WELCH, G. N., LOSCALZO, J., Homocysteine an atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v.338, p.1042-1050, 1998.

WILLCOX J.K., CATIGNANI G.L., LAZARUS S. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.1-18, 2003.

WILLET, W. C. **Eat, Drink, and be Healthys The HarVard Medical School Guide to Healthy Eating**; Simon and Schuster: New York, 2001.

YASUARA A., KAWADA K., SHIBAMOTO T., Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Method for Analysis of Trace Carbonyl Compounds in Foods and Beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.266, 1998.

ZANINI A. C.; OGA S. **Farmacologia aplicada**. 5ª ed, São Paulo: Atheneu, 1994, 739 p.

Capítulo 2

Validação de método para detecção de folatos livres em cervejas

Ana Cecília P. Rybka e Helena T. Godoy*

Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

* helena@fea.unicamp.br

RESUMO

Os folatos são um importante grupo de vitaminas hidrossolúveis do complexo B. Sua presença é necessária para a síntese de DNA e RNA e metilação da homocisteína em metionina, e sua deficiência está ligada ao aumento do risco de defeitos do tubo neural em fetos, desenvolvimento de anemia megaloblástica e doenças cardiovasculares. Este estudo teve como objetivo validar um método capaz de analisar cinco diferentes formas de folatos, ácido fólico, 10-metil-ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato, 5-formiltetraidrofolato e 10-formil-ácido fólico, em cervejas brasileiras, além de seu consumo no país ser bastante elevado. Para a análise, a cerveja foi diretamente injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência. No processo de separação utilizou-se coluna C18, sendo a eluição dos analitos realizada por gradiente de fase móvel ácido acético 2,0% (pH 2,8) com acetonitrila na vazão de 0,5 mL/min. A detecção foi realizada com o detector de arranjo de diodos a 290nm para detecção do ácido fólico e do 10-metil-ácido fólico; e detector de fluorescência a λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 360nm na detecção do 5-metiltetraidrofolato e 5-formiltetraidrofolato; e a λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 445nm para o 10-formil-ácido fólico. Os parâmetros avaliados e validados foram linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Os coeficientes de correlação encontrados variaram de 0,9970 a 0,9999 e os limites de detecção de 0,07 a 2,42 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, enquanto que os limites de quantificação estiveram entre 0,22 e 8,07 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Na avaliação de repetibilidade destes folatos foram obtidos CV entre 0,75 e 5,01% e para precisão intermediária o CV variou de 1,20 a 9,99%. Os ensaios de recuperação nos níveis avaliados estiveram entre 92 e 107%. Os folatos encontrados nas matrizes de cerveja foram o 10-formil-ácido fólico, o 5-metiltetraidrofolato e o 10-formil-ácido fólico e apresentaram concentração total variando de 18,26 a 23,99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Os resultados da validação realizada para o método proposto demonstram que o mesmo é bastante eficiente na determinação dos folatos livres em cervejas.

Palavras-chave: Validação, CLAE, folatos, cerveja

ABSTRACT

Folates are an important group of water-soluble vitamins of B complex. Their presence is necessary for DNA and RNA synthesis and metilation of homocistein in methionine, and their deficiency increases the risk of neural tube defects in embryos and of development of megaloblastic anemia. This study had as objective to validate a method capable to analyze five different folates forms: folic acid, 10-methyl-folic acid, 5-methyltetrahydrofolate, 5-formyltetrahydrofolate and 10-formyl-folic; in beers, moreover the fact that beer consumption in Brazil is very high. The beer is directly injected in the high performance liquid chromatograph, using a C18 reverse phase column. The analites elution was carried out by mobile phase gradient 2.0% acid acetic (pH 2.8) with acetonitrile by 0.5 mL/min flow. The folates detection was done with the diodes array detector in 290nm for detection of folic acid and 10-methyl-folic acid, and with fluorescence detector, in 290nm $\lambda_{exc.}$ and 360nm $\lambda_{emis.}$ for 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate detection; and 290nm $\lambda_{exc.}$ and 445nm $\lambda_{emis.}$ for 10-formyl-folic. The evaluated and validated parameters were linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. The correlation coefficients varied from 0.9970 to 0.9999 and the detection limits from 0.07 to 2.42 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, whereas the quantification limits had been between 0.22 and 8.07 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. In the repeatability evaluation of these folates, the percentage of variation had been between 0.75 and 5.01% and for intermediate precision the percentage of variation was from 1.20 to 9.99%. The recovery assays in the evaluated levels resulted between 92 and 107%. The folates found in beer matrices were 10-methyl-folic acid, 5-methyltetrahydrofolate and 10-formyl-folic, and the total levels were between 18.26 and 23.99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. The results of validation for the considered method demonstrate that it was very efficient for free folates determination in beers.

Key-words: Validation, HPLC, folates, beer

1. Introdução

O interesse pelos folatos, vitaminas do complexo B, tem crescido nos últimos anos com as descobertas relacionadas às suas funções nos vários processos metabólicos no organismo humano. Agem sobre a homocisteína, transformando-a em metionina, ajudando a evitar problemas cardíacos (Moat, Lang e McDowell, 2004); são essenciais na prevenção e redução significativa do risco de malformação do tubo neural na gestação (Locksmith e Duff, 1998; Daly et al., 1997; Duff e Cooper, 1994; Werler, et al., 1993; Kirke et al., 1992; Czeizel e Dudas, 1992; Milunsky et al., 1989); podem reduzir algumas doenças degenerativas como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson (Scott, Rébeille e Fletcher, 2000), e ainda prevenir doenças crônicas como depressão, e alguns tipos de câncer, como mama e cólon (Luccock, 2003; Alpert et al., 2000; Jacques et al., 1999; Eskes, 1997) e evitar a anemia megaloblástica (Asok, 2005). Assim, são fundamentais para o crescimento correto e para o funcionamento ótimo do sistema nervoso e da medula óssea (Dang, Arcot e Shrestha, 2000).

São encontrados em uma grande variedade de alimentos, e algumas técnicas no processamento podem aumentar suas concentrações, como os bioprocessos, incluindo fermentação. Entre os produtos de fermentação, a cerveja se destaca pela sua popularidade e consumo, sendo genericamente definida como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir do malte, “cevada germinada”, lúpulo, fermento e água de boa qualidade (Rodrigues, 2000).

Para realizar a determinação de folatos, podem ser aplicados métodos biológicos, químicos, microbiológicos, imunológicos ou físicos. Os métodos biológicos são caros e bastante demorados, além de possuir baixa repetibilidade; o método imunológico sofre interferência de diversos tipos de substâncias e a técnica microbiológica é mais precisa e reprodutível quando comparada aos métodos biológicos e químicos (Rader et al., 1998), porém não permite a determinação simultânea de diferentes tipos de folatos (Finglas et al., 1999). Uma das técnicas mais empregadas para esta determinação é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), método físico, devido à possibilidade de se determinar as diferentes formas de folatos ativos, em uma única análise (Konings, 1999; Catharino, 2004). É um método sensível e exato, além de fornecer a melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presentes nos alimentos, sendo a mais usada das técnicas analíticas (Agostino; 1996).

Os folatos têm absorção ultravioleta máxima que varia conforme o pH do tampão no qual estão inseridos (Eitenmiller e Landen, 1999; Temple Jr e Montgomery, 1984).

Alguns folatos têm a propriedade de fluorescer, permitindo a utilização do detector de fluorescência para o processo analítico, que é muito mais seletivo (Gregory et al., 1984). O 5-metiltetraidrofolato, e o 5-formiltetraidrofolato apresentam comprimentos de onda máximos similares, sendo cerca de 295-300 nm (excitação) e 356-360 nm (emissão) (Gounelle et al., 1989; Gregory et al., 1984). A fluorescência natural do 5-metiltetraidrofolato e do 5-formiltetraidrofolato tem a proporção de 10:1 (Gounelle et al., 1989).

Quando um método de análise de um determinado composto é definido, este método deve ser validado de modo a garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis. A matriz a ser analisada pode ser bastante complexa, como é o caso de alimentos, dificultando as análises e requerendo também uma validação específica do analito em seu meio.

A ISO 9000 (International Organization for Standardization) define validação como comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (DOQ-CGCRE-008, 2003). Neste contexto é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados seguros e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (DOQ-CGCRE-008, 2003).

O objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia para a determinação dos folatos livres em cervejas tipo Pilsen com álcool e sem álcool, bem como da cerveja tipo Malzbier na tentativa de estabelecer e aperfeiçoar um método para a determinação simultânea dos principais folatos (em sua forma livre) presentes em cervejas.

2. Materiais e Método

2.1. Material

As cervejas tipo Pilsen, Pilsen sem álcool e tipo Malzbier, foram adquiridas nos supermercados da região de Campinas. As amostras foram degaseificadas através do sistema de ultrassom por 10 minutos, filtradas e injetadas diretamente no cromatógrafo.

Os padrões foram diluídos em tampão acetato 0,05 mol/L. Injetou-se no cromatógrafo 20 µL tanto das soluções de padrões como das amostras.

Os padrões de ácido fólico, 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-metiltetraidrofolato), 10-metil ácido-fólico, 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-formiltetraidrofolato) e 10- formil-ácido-fólico foram adquiridos do Laboratório Dr. Schircks (Jona, Suíça). A acetonitrila grau cromatográfico e o ácido acético da foram adquiridos da Merck, Brasil. O hidróxido de potássio e o acetato de amônio ACS, grau analítico da Synth. A água utilizada no preparo dos padrões e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis e amostras foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700 Millipore), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

2.2. Equipamento e metodologia

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada no método para separação e detecção de folatos desenvolvido e validado por Catharino et al. (2006). Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100 (Agilent), com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com ajuste até 100 µL e equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência, dispostos em sequência. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu melhor tratamento dos dados. A coluna Vydac, fase reversa, com poro de 300Å, dp 5 µm, 150 X 3,2 mm d.i. foi utilizada para o processo cromatográfico.

A fase móvel utilizada para a separação dos folatos foi uma solução aquosa de ácido acético glacial 2,0%, com pH ajustado para 2,8 com KOH, a uma vazão de 0,5 mL/min. A identificação foi feita através dos tempos de retenção, espectros de absorção e co-cromatografia quando necessário.

Os analitos foram separados em sistema de eluição por gradiente, iniciando com 100% de solução aquosa de ácido acético, chegando em 18 minutos a 96% de solução de ácido acético e 4% de acetonitrila, seguindo de 18 a 25 minutos um novo gradiente, finalizando a corrida com 70% de solução de ácido acético e 30% de acetonitrila em 25 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos, antes da próxima injeção.

A detecção foi feita com o detector de arranjo de diodos ajustado para 290nm para detecção do ácido fólico e do 10-metil-ácido fólico; e o detector de fluorescência ajustado para λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 360nm na detecção de 5-metiltetraidrofolato e 5-

formiltetraidrofolato; e em λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 445nm para o 10-formil-ácido fólico. A quantificação foi realizada por curvas de padronização externas com mínimo de 5 pontos para cada folato. As curvas de calibração também foram utilizadas na avaliação da faixa de linearidade. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Validação do Método

2.3.1. Curvas de Calibração

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto analisado, dentro de uma determinada faixa de aplicação (Swartz e Krull, 1998). A ANVISA (ANVISA, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99.

As curvas de calibração para cada folato analisado (ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato, 5-formiltetraidrofolato, 10-formil-ácido fólico e 10-metil-ácido fólico) com mínimo de 5 pontos, foram preparadas através de diluições de uma solução concentrada dos padrões.

Soluções padrões foram preparadas e a variação de concentração foi de 5,0 a 50,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para ácido fólico, entre 1,25 e 40,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para 5-metiltetraidrofolato, de 2,0 a 40,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para 5-formiltetraidrofolato, de 0,23 a 15,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para 10-formil-ácido fólico e entre 0,31 e 10,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para 10-metil-ácido fólico.

2.3.2. Limites de detecção e quantificação

Para determinação do limite detecção, foram realizadas diluições sucessivas dos folatos (ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato, 5-formiltetraidrofolato, 10-formil-ácido fólico e 10-metil-ácido fólico) em concentrações conhecidas, até que se obtivesse um sinal como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($\text{sinal/ruído} \geq 3$), o valor da concentração de cada folato correspondente a estes sinais foram considerados como menor quantidade detectável.

Para o limite de quantificação considerou-se o valor da concentração de cada folato correspondente a dez vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento (Ribani et al., 2004).

2.3.3. Precisão

A avaliação da precisão foi realizada através da precisão intermediária e da repetibilidade do método para os folatos encontrados nas matrizes reais, não enriquecidas com padrões (5-metiltetraidrofolato, 10-formil-ácido fólico e 10-metil-ácido fólico).

Para avaliação da precisão intermediária foram realizadas determinações de três níveis de concentração (nível encontrado na matriz, nível de adição 1 e nível de adição 2), em três determinações consecutivas, realizadas por três diferentes dias. Para a análise da repetibilidade foram realizadas 10 determinações consecutivas de três diferentes níveis de cada folato.

Para a cerveja tipo Pilsen adicionou-se padrões no nível 1 e no nível 2, respectivamente, 2,0 e 4,2 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 2,0 e 3,7 µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 2,1 e 4,3 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico.

Foram adicionados respectivamente no nível 1 e no nível 2, 2,6 e 5,0 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 1,7 e 19,0µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 1,2 e 2,6 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico para a cerveja sem álcool, e para a cerveja Malzbier no nível 1 e no nível 2, respectivamente, de 3,0 e 4,0 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 3,4 e 8,5 µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 1,7 e 3,1 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico.

2.3.4. Exatidão

Para a exatidão do método (Rodriguez et al., 1995; Ribani et al., 2004), realizaram-se testes de recuperação dos padrões adicionados dos folatos encontrados nas matrizes. Para essa determinação, analisou-se inicialmente, o teor dos folatos naturalmente presentes em uma matriz de cerveja com diluição 1:1 em tampão acetato, através de 10 análises.

Posteriormente, adicionou-se padrões (com proporção 1:1 em relação à cerveja) no nível 1 e no nível 2, respectivamente, 2,0 e 4,2 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 2,0 e 3,7 µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 2,1 e 4,3 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico para a cerveja tipo Pilsen; 2,6 e 5,0 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 1,7 e 19,0µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 1,2 e 2,6 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico para a cerveja tipo Pilsen sem álcool; e 3,0 e 4,0 µg/100mL de 10-metil-ácido fólico; 3,4 e 8,5 µg/100mL de 5-metiltetraidrofolato e 1,7 e 3,1 µg/100mL de 10-formil-ácido fólico para a cerveja tipo Malzbier; calculando-se a recuperação de acordo com Rodriguez et al. (1995), através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra})}{\text{Concentração adicionada}} \times 100\%$$

3. Resultados e Discussão

3.1. Separação dos folatos

As diferenças de protonação e polaridade das diferentes formas de folatos determinam a ordem de eluição no sistema utilizado (fase móvel com pH = 2,8), conforme já discutido por Patring (2007).

Para os folatos analisados, os tempos de retenção encontrados foram 22,7 minutos para o ácido fólico e 24,2 minutos para o 10-metil-ácido fólico em DAD a 290 nm; 11,3 minutos para o 5-metiltetraidrofolato e 19,5 minutos para o 5-formiltetraidrofolato em detector de fluorescência com λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 360nm; e 18,1 minutos para o 10-formil-ácido fólico com λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 445nm. Na Figura 1 e 2 estão apresentados os cromatogramas obtidos com a mistura de padrões (Figura 1) e as cervejas analisadas (Figura 2). Foram detectados nas amostras somente o 10-metil-ácido fólico, o 5-metiltetraidrofolato e o 10-formil-ácido fólico. Os níveis totais de folatos encontrados foram de 18,26 a 23,99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$.

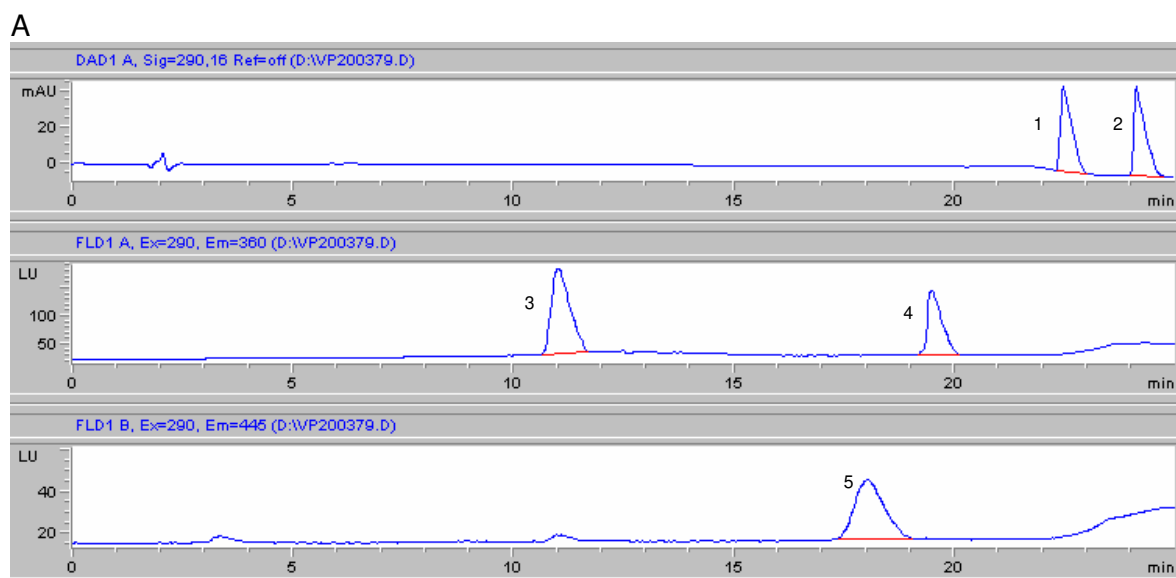
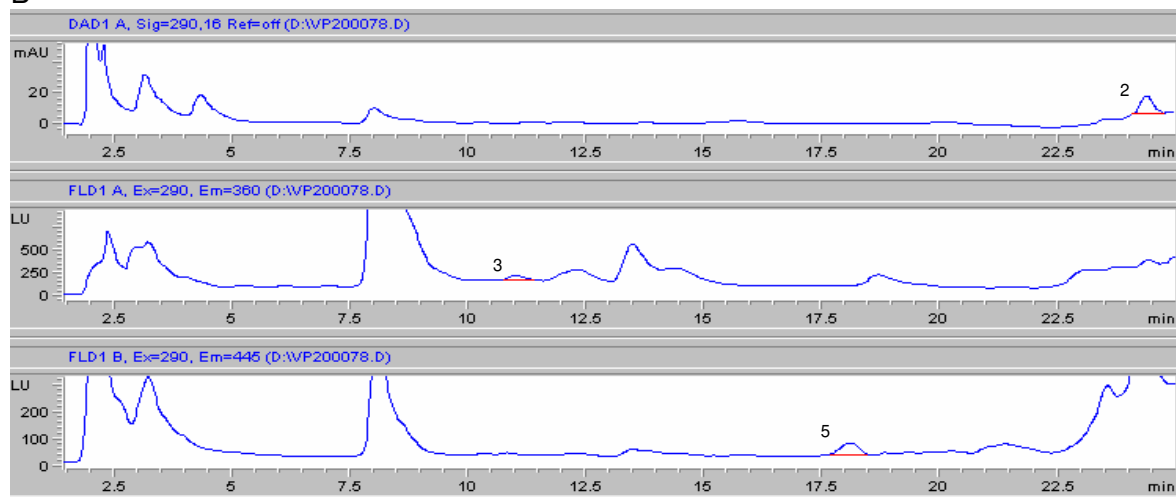
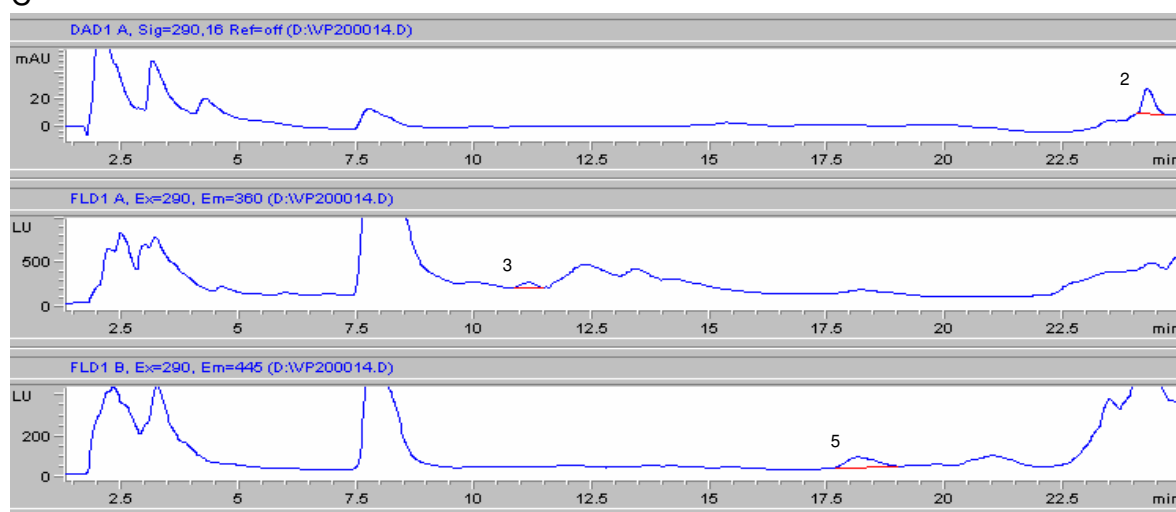


Figura 1: Perfil cromatográfico obtido através do método validado para os padrões de folatos analisados. Os picos identificados são ácido fólico (1), 10-metil-ácido fólico (2), 5-metiltetraidrofolato (3), 5-formiltetraidrofolato (4) e 10-formil-ácido fólico (5).

B



C



D

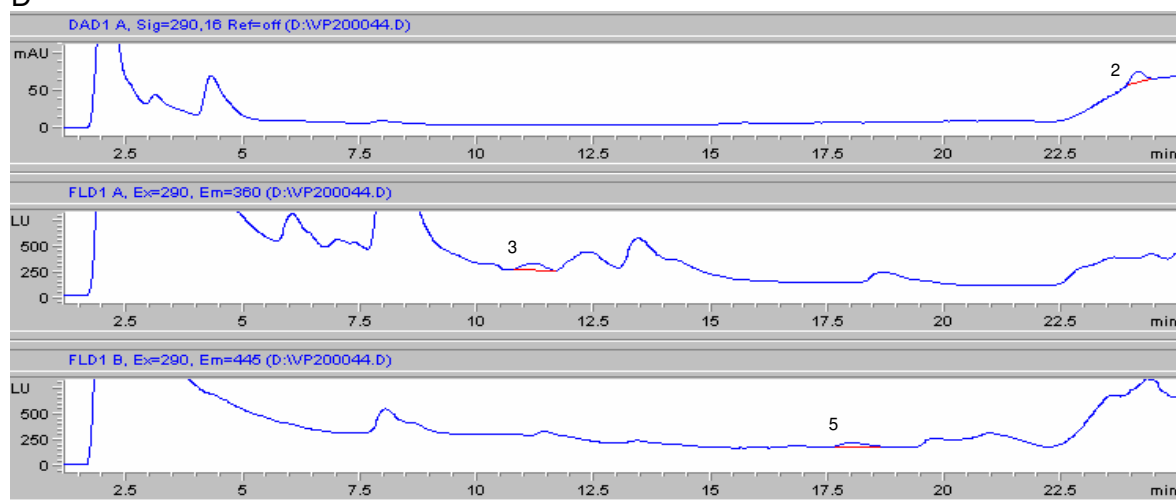


Figura 2: Perfil cromatográfico obtido através do método validado para a cerveja Pilsen (B), Pilsen sem álcool (C) e Malzbier (D). Os picos identificados são o 10-metil-ácido fólico (2), 5-metitetraidrofolato (3) e 10-formil-ácido fólico (5).

3.2. Curvas de Calibração

Cada ponto das curvas de calibração para os folatos foi realizado em triplicata. Foram encontradas boas linearidades para as faixas avaliadas. Para o ácido fólico $R^2 = 0,9970$ para o 5-metiltetraidrofolato $R^2 = 0,9988$, para o 5-formiltetraidrofolato $R^2 = 0,9978$, para o 10-formil-ácido fólico $R^2 = 0,9999$ e para o 10-metil-ácido fólico $R^2 = 0,9998$.

Um coeficiente de correlação maior que 0,9990 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Shabir, 2003). Silva et al. (2009) em seu trabalho obtiveram coeficientes de determinação variando entre 0,9761 e 0,9931, Catharino et al. (2006) de 0,9878 e 1,0000.

3.3. Limites

Os limites de detecção e quantificação para os folatos avaliados foram, respectivamente, 2,42 e 8,07 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para o ácido fólico, 0,08 e 0,26 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para o 10-metil-ácido fólico; 0,25 e 0,83 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de 5-metiltetraidrofolato, 0,07 e 0,22 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de 10-formil-ácido fólico e 0,90 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ de 5-formiltetraidrofolato. Os valores obtidos para limite de detecção são similares aos encontrados por Silva et al. (2009), iguais a 0,2 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para o 5-metiltetraidrofolato, e 2,8 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para o 5-formiltetraidrofolato. Catharino et al. (2006) obtiveram limites de até 0,5 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ para folatos, com injeção de 100 μL , 5 vezes a quantidade injetada neste trabalho.

3.4. Precisão

3.4.1. Repetibilidade

Para a análise da precisão, em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Huber, 1998). Os CV% obtidos para todas as amostras variaram de 0,75 a 6,45%.

Os resultados da avaliação de repetibilidade dos folatos encontrados nas matrizes estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Repetibilidade para os folatos encontrados na cerveja tipo Pilsen.

Cerveja Pilsen	Concentração de 10-metil-ácido fólico	CV %	Concentração de 5-metil-tetraidrofolato	CV %	Concentração de 10-formil-ácido fólico	CV %
Nível encontrado na Matriz ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	4,25	5,01	4,76	4,95	4,58	1,53
	4,20		4,79		4,60	
	4,20		4,81		4,60	
	4,55		5,28		4,68	
	4,77		5,51		4,74	
	4,69		5,20		4,64	
	4,82		4,96		4,73	
	4,64		5,24		4,78	
	4,58		4,97		4,61	
	4,58		5,22		4,71	
Nível de adição 1 ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	6,40	1,00	6,86	2,29	6,63	1,35
	6,51		7,13		6,71	
	6,32		6,93		6,46	
	6,37		6,72		6,67	
	6,28		7,20		6,59	
	6,41		6,84		6,73	
	6,38		7,00		6,50	
	6,35		6,88		6,57	
	6,37		6,91		6,63	
	6,31		6,71		6,69	
Nível de adição 2 ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	8,97	0,75	9,06	0,83	9,25	0,98
	8,94		8,93		9,09	
	8,94		9,08		9,15	
	8,76		9,11		9,05	
	8,84		9,09		8,99	
	8,79		8,90		9,05	
	8,91		8,98		8,99	
	8,85		8,91		8,94	
	8,87		9,03		9,05	
	8,91		9,01		9,06	

CV%: Coeficiente de variação para as 10 determinações consecutivas de cada folato em cada nível

Tabela 2: Repetibilidade para os folatos encontrados na cerveja tipo Pilsen sem álcool.

Cerveja Pilsen sem Álcool	Concentração de 10-metil-ácido fólico	CV %	Concentração de 5-metil-tetraidrofolato	CV %	Concentração de 10-formil-ácido fólico	CV %
Nível encontrado na Matriz (µg/100mL)	4,95	2,15	8,75	0,87	2,63	4,43
	4,64		8,77		2,57	
	4,90		8,64		2,65	
	4,78		8,87		2,78	
	4,71		8,61		2,68	
	4,64		8,74		2,74	
	4,74		8,67		2,63	
	4,81		8,71		2,98	
	4,75		8,74		2,85	
	4,72		8,80		2,70	
Nível de adição 1 (µg/100mL)	7,49	1,60	10,06	3,64	3,77	1,13
	7,23		10,48		3,79	
	7,33		10,05		3,81	
	7,19		9,92		3,85	
	7,22		10,03		3,87	
	7,28		10,47		3,83	
	7,08		10,33		3,86	
	7,23		11,22		3,91	
	7,12		10,49		3,88	
	7,21		10,28		3,84	
Nível de adição 2 (µg/100mL)	9,64	1,56	29,06	4,73	5,37	2,51
	9,88		29,20		5,43	
	9,63		30,12		5,06	
	9,82		30,42		5,41	
	9,99		30,22		5,48	
	9,99		29,73		5,49	
	9,93		28,84		5,48	
	10,10		28,45		5,46	
	9,92		25,90		5,48	

CV%: Coeficiente de variação para as 10 determinações consecutivas de cada folato em cada nível

Tabela 3: Repetibilidade para os folatos encontrados na cerveja tipo Malzbier.

Cerveja Malzbier	Concentração de 10-metil-ácido fólico	CV %	Concentração de 5-metil-tetraidrofolato	CV %	Concentração de 10-formil-ácido fólico	CV %
Nível encontrado na Matriz (µg/100mL)	3,65	3,32	6,96	6,45	3,88	3,50
	3,81		6,93		4,09	
	3,77		6,85		4,29	
	3,65		6,72		4,00	
	4,00		6,41		3,91	
	3,99		5,85		3,83	
	3,83		6,30		3,95	
	3,68		5,99		3,98	
	3,80		6,40		3,85	
	3,70		5,97		3,86	
Nível de adição 1 (µg/100mL)	6,38	4,32	9,77	1,68	5,61	2,08
	6,63		9,79		5,69	
	7,29		9,74		5,37	
	6,96		9,70		5,67	
	6,38		9,30		5,61	
	6,56		9,48		5,49	
	6,54		9,69		5,44	
	6,51		9,49		5,41	
	6,60		9,57		5,43	
	6,43		9,51		5,56	
Nível de adição 2 (µg/100mL)	7,85	4,01	14,22	4,90	7,18	2,18
	8,45		14,47		7,52	
	7,80		15,64		7,37	
	8,10		15,31		7,25	
	7,71		15,50		7,22	
	8,33		15,43		7,19	
	7,61		15,67		7,22	
	7,59		16,58		6,94	
	8,06		16,56		7,06	
	8,37		15,83		7,18	

CV%: Coeficiente de variação para as 10 determinações consecutivas de cada folato em cada nível

3.4.2. Precisão Intermediária

Para a precisão intermediária, cada amostra foi aberta e imediatamente acondicionada em três embalagens de vidro âmbar sem headspace. Cada recipiente só foi aberto novamente no dia da avaliação. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrão. Nesta avaliação, o maior CV% encontrado foi de 9,99%.

Os valores obtidos para a precisão intermediária estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4: Precisão intermediária para os folatos encontrados na cerveja tipo Pilsen.

Concentração (µg/100mL) de 10-metil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	5,57	5,39	5,27	3,80
	5,57	5,34	5,22	
	5,69	5,26	5,13	
	*5,61 ± 0,07; 1,23%	*5,33 ± 0,07; 1,26%	*5,21 ± 0,07; 1,42%	
Nível de adição 1	5,96	5,89	5,30	7,63
	6,11	5,62	5,23	
	6,18	5,72	5,14	
	*6,08 ± 0,11; 1,79 %	* 5,75 ± 0,14; 2,45%	*5,22 ± 0,08; 1,54%	
Nível de adição 2	6,78	6,50	6,14	5,73
	6,75	6,51	6,04	
	6,98	6,45	6,09	
	*6,83 ± 0,12; 1,81%	*6,49 ± 0,03; 0,43%	*6,09 ± 0,05; 0,77%	
Concentração (µg/100mL) de 5-metiltetraidrofolato				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	7,35	7,13	6,97	4,15
	7,72	7,07	6,89	
	7,47	7,07	6,94	
	*7,51 ± 0,19; 2,50%	*7,09 ± 0,03; 0,47%	*6,93 ± 0,04; 0,62%	
Nível de adição 1	15,02	14,83	14,57	1,87
	15,24	14,78	14,51	
	14,93	14,76	14,44	
	*15,06 ± 0,16; 1,08%	*14,79 ± 0,04; 0,25%	*14,50 ± 0,07; 0,45%	
Nível de adição 2	24,22	23,62	23,39	1,46
	24,00	23,59	23,40	
	23,97	23,57	23,38	
	*24,06 ± 0,14; 0,58%	*23,59 ± 0,03; 0,12%	*23,39 ± 0,01; 0,04%	
Concentração (µg/100mL) de 10-formil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	12,26	12,10	11,92	1,20
	12,05	12,03	11,89	
	12,27	12,00	11,91	
	*12,19 ± 0,13; 1,01%	*12,05 ± 0,05; 0,44%	*11,90 ± 0,02; 0,14%	
Nível de adição 1	14,35	14,01	13,81	1,96
	14,27	14,06	13,75	
	14,32	13,93	13,74	
	*14,31 ± 0,04; 0,29%	*14,00 ± 0,06; 0,45%	*13,77 ± 0,04; 0,29%	
Nível de adição 2	16,56	16,53	16,25	1,53
	16,90	16,41	16,20	
	16,73	16,44	16,22	
	*16,73 ± 0,17; 1,01%	*16,46 ± 0,06; 0,39%	*16,22 ± 0,03; 0,15%	

*Média dos valores ± estimativa do desvio padrão, %variação entre a triplicata.

** Coeficiente de variação entre os 3 dias

Tabela 5: Precisão intermediária para os folatos encontrados na cerveja tipo Pilsen sem álcool.

Concentração (µg/100mL) de 10-metil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	5,42	5,13	4,50	9,99
	5,47	5,07	4,49	
	5,49	4,92	4,42	
	*5,46 ± 0,04; 0,74%	*5,04 ± 0,10; 2,05%	*4,47 ± 0,04; 0,96%	
Nível de adição 1	6,51	6,30	5,62	8,81
	6,67	6,12	5,51	
	6,62	6,15	5,50	
	*6,59 ± 0,08; 1,23%	*6,19 ± 0,09; 1,50%	*5,54 ± 0,07; 1,18%	
Nível de adição 2	7,54	7,04	6,59	6,78
	7,52	7,02	6,63	
	7,53	6,98	6,52	
	*7,53 ± 0,02; 0,18%	*7,01 ± 0,03; 0,48%	*6,58 ± 0,05; 0,82%	
Concentração (µg/100mL) de 5-metiltetraidrofolato				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	5,43	5,09	5,01	4,32
	5,50	5,19	5,05	
	5,48	5,24	5,00	
	*5,47 ± 0,04; 0,70%	*5,18 ± 0,07; 1,41%	*5,02 ± 0,02; 0,47%	
Nível de adição 1	6,61	6,42	6,33	1,92
	6,57	6,43	6,36	
	6,61	6,47	6,36	
	*6,59 ± 0,03; 0,34%	*6,44 ± 0,03; 0,42%	*6,35 ± 0,02; 0,33%	
Nível de adição 2	10,14	9,92	9,76	2,09
	10,11	9,93	9,74	
	10,20	9,87	9,72	
	*10,15 ± 0,05; 0,46%	*9,91 ± 0,03; 0,29%	*9,74 ± 0,02; 0,17%	
Concentração (µg/100mL) de 10-formil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	5,60	5,37	5,14	4,46
	5,59	5,35	5,07	
	5,49	5,39	5,09	
	*5,56 ± 0,06; 1,14%	*5,37 ± 0,02; 0,41%	*5,10 ± 0,04; 0,72%	
Nível de adição 1	7,49	7,25	6,62	6,61
	7,48	7,24	6,67	
	7,78	7,19	6,67	
	*7,58 ± 0,17; 2,27%	*7,23 ± 0,04; 0,50%	*6,64 ± 0,03; 0,40%	
Nível de adição 2	9,98	9,75	9,55	2,44
	9,94	9,79	9,51	
	10,08	9,82	9,50	
	*9,99 ± 0,07; 0,72%	*9,79 ± 0,03; 0,31%	*9,52 ± 0,03; 0,27%	

*Média dos valores ± estimativa do desvio padrão, %variação entre a triplicata.

** Coeficiente de variação entre os 3 dias

Tabela 6: Precisão intermediária para os folatos encontrados na cerveja tipo Malzbier.

Concentração (µg/100mL) de 10-metil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	5,53	5,18	5,11	5,71
	5,42	5,21	4,79	
	5,57	5,26	4,82	
	*5,50 ± 0,08; 1,37%	*5,21 ± 0,04; 0,78%	*4,91 ± 0,18; 3,61%	
Nível de adição 1	7,76	7,20	6,59	8,05
	7,69	7,03	6,62	
	7,80	7,08	6,60	
	*7,75 ± 0,05; 0,69%	*7,10 ± 0,09; 1,25%	*6,60 ± 0,01; 0,20%	
Nível de adição 2	8,49	7,81	7,75	4,55
	8,32	7,84	7,72	
	8,40	7,93	7,67	
	*8,40 ± 0,09; 1,03%	*7,86 ± 0,06; 0,80%	*7,71 ± 0,04; 0,53%	
Concentração (µg/100mL) de 5-metiltetraidrofolato				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	11,98	11,86	11,64	1,69
	11,99	11,84	11,55	
	11,97	11,89	11,58	
	*11,98 ± 0,01; 0,06%	*11,86 ± 0,03; 0,22%	*11,59 ± 0,04; 0,38%	
Nível de adição 1	13,10	12,96	12,56	2,39
	13,43	12,87	12,58	
	12,98	12,90	12,52	
	*13,17 ± 0,23; 1,78%	*12,91 ± 0,05; 0,37%	*12,56 ± 0,03; 0,27%	
Nível de adição 2	17,37	17,06	16,78	1,85
	17,46	17,01	16,79	
	17,45	16,99	16,83	
	*17,42 ± 0,05; 0,29%	*17,02 ± 0,04; 0,21%	*16,80 ± 0,02; 0,15%	
Concentração (µg/100mL) de 10-formil-ácido fólico				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	CV%**
Nível encontrado na Matriz	12,71	12,17	11,94	2,42
	12,46	12,15	12,00	
	12,50	12,20	11,98	
	*12,56 ± 0,13; 1,04%	*12,18 ± 0,02; 0,19%	*11,97 ± 0,03; 0,28%	
Nível de adição 1	13,47	13,36	13,15	1,76
	13,63	13,35	13,11	
	13,65	13,31	13,08	
	*13,58 ± 0,10; 0,71%	*13,34 ± 0,03; 0,19%	*13,11 ± 0,04; 0,27%	
Nível de adição 2	16,02	15,87	15,53	1,74
	16,05	15,84	15,48	
	15,99	15,87	15,45	
	*16,02 ± 0,03; 0,17%	*15,86 ± 0,02; 0,13%	*15,48 ± 0,04; 0,25%	

*Média dos valores ± estimativa do desvio padrão, %variação entre a triplicata.

** Coeficiente de variação entre os 3 dias

3.5. Exatidão

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120% (Ribani et al., 2004).

Para a cerveja Pilsen, a recuperação encontrada para o 10-metil-ácido fólico nos níveis 1 e 2, foram 92 e 104%; para o 5-metiltetraidrofolato 92 e 106%; e para o 10-formil-ácido fólico 93 e 102%, respectivamente.

A cerveja tipo Pilsen sem álcool resultou em valores de recuperação de 95 e 102% para o 10-metil-ácido fólico, 94 e 107% para o 5-metiltetraidrofolato e 94 e 103% para o 10-formil-ácido fólico nos níveis avaliados. Os folatos na cerveja Malzbier apresentaram recuperação de 95 e 105% para o 10-metil-ácido fólico, 93 e 107% para o 5-metiltetraidrofolato e 92 e 105% para o 10-formil-ácido fólico nos níveis 1 e 2 adicionados, respectivamente.

A recuperação encontrada nas análises dos três tipos de cerveja oscilou entre 92 e 107%, muito próxima a obtida por Patring (2007), que alcançou de 89% a 106% de recuperação em suas análises, por Silva et al. (2009), em média de 87,86 a 106,69% para hortaliças, por Lima (2005), que obteve de 90 a 95% e por Catharino et al. (2006), que obtiveram de 94 a 108% de recuperação de folatos em material certificado. Owens et al. (2007) que analisaram o 5-metiltetraidrofolato em cervejas utilizando extração, encontraram, em alguns de seus testes, de 85% a 101% de recuperação com detector de fluorescência.

4. Conclusões

O método apresentou-se bastante aplicável para detecção de folatos livres em cervejas. O cromatograma das amostras, mesmo sem prévia limpeza, apresentou os folatos estudados bem separados, com resolução comum à cromatografia líquida de alta eficiência.

Os parâmetros de validação avaliados apresentaram recuperação e coeficientes de variação indicando método preciso e exato, e as curvas de calibração obtidas

apresentaram coeficiente de correlação indicando excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Os limites de quantificação dos folatos encontrados foram bastante baixos.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

6. Referências Bibliográficas

AGOSTINO, T. S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea, por CLAE, das vitaminas B1, B2, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos**, 1996, 81p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 544-546, 2000.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.

ASOK C. A., **Megaloblastic anemias**. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology. Basic Principles and Practice. 2 ed.. Nova York: Churchill Livingstone, 2005, p. 519-556.

CATHARINO, R. R., PALLONE, J. A. L., GODOY H. T., Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.

CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Folatos em Alimentos**, 2004, 96p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.

CZEIZEL A.E., DUDÁS I.; Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n.26, p.1832-1835. 1992.

DALY, S; MILLS, J.R; MOLLOY, A.M; CONLEY, M; LEE, Y.J; KIRKE P.N; WEIR, D.G; SCOTT, J.M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **The Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1666-1669, 1997.

DANG, J.; ARCOT J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 295-298, 2000.

DOQ-CGCRE-008 – Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 01; p. 35; março 2003.

DUFF E. M., COOPER E. S.; Neural tube defects in Journal of the American Medical Association following Hurricane Gilbert. **American Journal of Public Health**, v. 84, n.3, p.473-476, 1994.

EITENMILLER, R. R. ,LANDEN, W. O. J. Folate. In: **Vitamin analysis for health and food sciences**. Eds. R.R. Eitenmiller & W.O.J. Landen. CRC Press. New York. 1999. p. 411-466.

ESKES T. K. A. B., Folates and the fetus, **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.71, p.105-111. 1997.

FINGLAS, P. M., WIGERTZ, K., VAHTERISTO, L. WITTHÖFT, C., SOUTHON, S., FROIDMONT-GÖRTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. **Food Chemistry**, v. 64, p.245-255, 1999.

GOUNELLE, J.C., LADJIMI, H.; PROGNON, P.. A rapid and specific extraction procedure for folates determination in rat-liver and analysis by high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection. **Analytical Biochemistry**, v.176, p.406-411. 1989.

GREGORY, J.F., SARTAIN, D.B.; DAY, B.P.F. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. **Journal of Nutrition**, v.114, p.341-353. 1984.

HUBER, L.; Validation of analytical methods: review and strategy **LC-GC International**, v.11, p.96-105.1998.

JACQUES, P. F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 19, p. 1449-1454, 1999.

KIRKE P. N., DALY L. E.; A randomized trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. **Archives of Disease in Childhood**, v.67, p.1442-1443. 1992.

KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **Journal of AOAC International**, v.82, n.1, p.119-127, 1999.

LIMA, J. A., **Folatos em Vegetais** – Influência do Tipo de Cultivo e do Processamento, 2005, 84p, Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2005.

LOCKSMITH G. J.; DUFF P. Preventing neural tube defects: the importance of periconceptional folic acid Supplements. **Obstetrics & Gynecology**, v.91, p.1027-1034, 1998.

LUCOCK M. Z., YATES, Z., GLAVILLE, T., LEEMING, R., SIMPSON, N., DASKALAKIS, I., A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. **Nutrition Research**, v.23, n.11, p.1463-1475, 2003.

MILUNSKY A, JICK H, JICK SS, Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**, v.262, p.2847-2852, 1989.

MOAT, S. J., LANG, D., McDOWELL, I. F. W., Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.15, p.64-79, 2004.

OWENS J E., CLIFFORD A. J., BAMFORTH C. W. Folate in Beer. **Journal of the The Institute of Brewing**, v.113, n.3, p.243–248, 2007.

PATRING J. **Development and Validation of Chromatographic Methods to Study Folate Derivatives Produced by Yeasts**. 2007, 65p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2007.

RADER O., KIMURA A., KAMAKURA N., AN K. S., KAKIZAKI A., MIYANISHI S., AKINAGA H., SHIRAI M., SHIMADA K., FUJIMORI A., Exchange splittings of Mn- and Sb-derived states by spin-resolved valence-band photoemission of MnSb. **Physical Review B**, v. 57, p. 689 - 692.1998.

RIBANI M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. C. P. **Perfil sensorial e aceitação de cervejas comercializadas no mercado brasileiro – treinamento e monitoramento de julgadores**, 2001, 196p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2000.

RODRIGUEZ, L.C., CAMPANA, A.M.G., BARRERO, F.A., LINARES, C.J., CEBA, M.R. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 471-476, 1995.

SCHNABEL, R., LACKNER, K. J., RUPPRECHT, H. J., Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, p. 1631-1637, 2005.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review; Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 795-824, 2000.

SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66. 2003.

SHAW G.M., SCHAFFER D., VELIE E.M., Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. **Epidemiology**, v. 6, p. 219-226, 1995.

SILVA, E.R; DELLA LUCIA, C.M; OLIVEIRA, D.S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M; REIS, B.D.L; LOBATO, A.L. Otimização de metodologia para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência. Envio 18 de junho de 2009.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S.; Validação de métodos cromatográficos **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n.12-20. 1998.

TEMPLE JR, C.; MONTGOMERY, J.A. Chemical and physical properties of folic acid and reduced derivatives. In **Folates and pterins**. Eds. R.L. Blakley & J.S. Benkovic. John Wiley & sons. New York. 1984. p. 61-120.

WERLER M. M., SHAPIRO S., MITCHELL A. A., Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. **Journal of the American Medical Association**, v.269, p. 257-1261. 1993.

Capítulo 3

Teor de folatos livres durante a vida de prateleira de cervejas

Ana Cecília P. Rybka e Helena T. Godoy*

Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

* helena@fea.unicamp.br

RESUMO

Folatos são um grupo de vitaminas do complexo B representado por compostos que variam pelo estado de oxidação da estrutura do anel de pteridina e pelo seu número de resíduos de glutamatos conjugados. São essenciais na prevenção de doenças crônicas como câncer de mama e cólon, mal de Alzheimer e depressão e estão presentes naturalmente em alimentos vegetais. No entanto, alguns processos tecnológicos podem aumentar a concentração de folatos, como por exemplo a fermentação, já que as leveduras são grandes fontes da vitamina. A cerveja é produzida através de matérias primas vegetais e sofre fermentação durante sua produção, de modo a se tornar forte candidata a fonte de folatos. Dados da literatura apontam neste sentido. Este trabalho teve o objetivo de quantificar o teor de folatos presentes em cervejas brasileiras e avaliar a estabilidade da vitamina durante a vida de prateleira do produto, além de avaliar as quantidades de folatos presentes em diferentes tipos de cerveja, como a Pilsen, sem álcool e Malzbier, nas embalagens lata e garrafa. Para tal foi utilizado um método em cromatografia líquida de alta eficiência com fase móvel composta de solução de ácido acético e acetonitrila em corrida por gradiente, coluna C18 e detectores de arranjo de diodos e fluorescência dispostos em série. Os folatos encontrados na cerveja foram 10-metil-ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato e 10-formil-ácido fólico. Os folatos presentes em diferentes lotes de cerveja tiveram grande variação, com CVs de até 52,42%. Os níveis de folatos totais encontrados nas cervejas recém fabricadas entre tipos de cerveja variaram de 18,26 a 23,99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. De modo geral o teor de folatos presente decresceu ao longo da vida de prateleira, porém não se pôde afirmar que uma embalagem ou outra possua maior capacidade de proteção contra a degradação da vitamina. Da mesma forma, não houve grande diferença entre o teor de folatos presentes nos três tipos de cerveja avaliados. Pode-se considerar a cerveja como fonte de folatos.

Palavras-chave: Cerveja, folatos, vida-de-prateleira, CLAE

ABSTRACT

Folates are a group of B vitamins that represents compounds that vary by the oxidation state of the structure of the pteridine ring and their number of glutamate conjugates residues. They are essential in the prevention of chronic diseases such as breast cancer and colon cancer, Alzheimer's and depression, and are naturally present in vegetables. However, some technological processes can increase the concentration of folates, such as fermentation, as yeasts are great sources of this vitamin. Beers are produced by vegetable raw materials and during production undergoes fermentation, in order to become a strong candidate for folate source. Data from literature goes in this direction. This study aimed to quantify the amount of folate found in Brazilian beers and evaluate the vitamin stability during the shelf life of the product, to evaluate the amount of folate found in different types of beer, such as Pilsen, alcohol and Malzbier, as the packaging cans and bottles. For this, it was used a method in high-performance liquid chromatography with mobile phase containing acetic acid and acetonitrile by gradient run, C18 column and diode array and fluorescence detectors arranged in series. The validation for the product in question was performed by Rybka and Godoy (2010). Folates found in beer were 10-methyl-folic acid, 5-methyltetrahydrofolate and 10-formyl-folic acid. Folates that are present in different batches of beer had great variation, with RSD until 52.42%. The total folate levels found in fresh beer for types of beer varied from 18.26 to 23.99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$. Overall folate levels found decreased over the shelf life, but it was not possible to verify that one package has greater ability to protect against the degradation of the vitamin than another. Similarly, there was not significant difference between folate levels found in the three types of beer evaluated, they may be considered as a folate source.

Keywords: Beer, folate, shelf life, HPLC

1. Introdução

Folato é um grupo de vitaminas do complexo B, com estruturas e atividades semelhantes ao ácido fólico (Brody, 1991; Zanini e Oga, 1994, de Bree et al., 1997), que tem recebido considerável interesse devido a seus efeitos de promoção da saúde. São vitaminas essenciais, que possuem um papel chave nas reações de transferência de carbono, que ocorrem na biossíntese de DNA, e no ciclo da metilação (Katzung, 1994; Devlin, 1997; Blount et al., 1997; Scott, Rébeille e Fletcher, 2000; Trumbo 2003; Paz e Navarro, 2006). Os folatos são formados por compostos que variam pelo estado de oxidação da estrutura do anel de pteridina e pelo seu número de resíduos de glutamatos conjugados (Eittenmiller, Landen e Augustin, 1998; Brouwer et al., 2008), estando naturalmente presentes em alimentos (Franco, 1992).

Folatos são também essenciais na prevenção de doenças crônicas como câncer de mama e cólon, mal de Alzheimer e depressão (Lucock, 2000; Alpert et al., 2000; Jacques et al., 1999; Malinow et al., 1998; Kim, 1999; Eskes, 1997). Segundo Selhub e Rosenberg (1996), a segunda metade do século XX pode ser classificada pelo surgimento de novas pesquisas sobre absorção, metabolismo e características do ensaio de folatos que levaram a novas descobertas de sua importância. Entre os efeitos de promoção da saúde dos folatos, a diminuição do risco de defeitos do tubo neural (DTN) é bem conhecida, já que os DTN são a forma mais comum de malformação, assim como a prevenção de doenças cardíacas (Bjorklund e Gordon, 2006).

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo (DANE, 2001). Uma nova classe de fatores de risco emergentes para doenças cardiovasculares é o nível plasmático de homocisteína (Gravina-Taddei et al., 2005), que é um aminoácido sulfurado que resulta como um produto intermediário da via de degradação da metionina. O estilo de vida e defeitos genéticos, tais como deficiência nos níveis de ácido fólico, podem desempenhar o papel de cofatores que aumentam os níveis de homocisteína. Alguns estudos têm mostrado que até 10% dos eventos coronários podem ser atribuídos ao aumento dos níveis de homocisteína (Boushey et al. 1995), enquanto outros estudos têm mostrado uma correlação inversa entre os níveis de homocisteína e os níveis plasmáticos de folatos (Selhub et al., 1993; Wald, Law e Morris, 2002). Assim, a hiper-homocisteinemia é um novo fator de risco cardiovascular que pode ser modificado pelo consumo de folatos (Schnyder, Roffi e Flammer, 2002).

Os folatos estão naturalmente presentes em alguns alimentos, porém algumas técnicas no processamento podem aumentar suas concentrações, como os bioprocessos, incluindo fermentação (Seyoum e Selhub, 1998; Osseyi, Ewhling e Albrecht, 2001; Kariluoto et al., 2004). Produtos que tem na sua fabricação a presença de leveduras, como os pães de farinha de trigo (Arcot, et. al., 2002), pães de centeio (Kariluoto, et al., 2006), leites fermentados (Crittenden, et. al., 2002), vinhos e cervejas (Seyoum e Selhub, 1998) têm a sua quantidade de folatos aumentada no final do processo. Esse aumento ocorre, segundo Kariluoto et. al. (2006), em função da presença das leveduras nas etapas de fermentação do processamento desses produtos. Estes autores descreveram que a habilidade de leveduras típicas de fermento, como o *Saccharomyces cerevisiae* (levedura típica na fermentação de cervejas) para produzir folatos em meios específicos para o crescimento dos microorganismos é maior que de outros tipos de levedura e bactérias.

Existem diversos relatos de cerveja como fonte de vitaminas B. A tiamina é relativamente deficiente na cerveja mas outras vitaminas do complexo B podem estar presentes em quantidades significativas (Owens et al., 2007). Segundo Jägerstad et al. (2005) para aqueles que consomem cervejas regularmente, a ingestão de folatos através da bebida pode estar entre 10-20% das necessidades diárias. Mayer et al. (2001) analisou o sangue de consumidores de cerveja na Alemanha, e concluiu que seu consumo aumenta os níveis de folatos no organismo e diminui os níveis de homocisteína. Assim, este trabalho teve o objetivo de quantificar os folatos presentes nos tipos de cerveja mais consumidos no Brasil, Pilsen e Malzbier, e também na versão Pilsen sem álcool, e acompanhar a estabilidade destes folatos durante os meses de validade do produto, comparando a eficiência de proteção dos folatos nas embalagens de lata e garrafas âmbar.

2. Material e método

2.1. Material

As amostras de cervejas foram adquiridas nos supermercados da região de Campinas, sendo cerveja tipo Pilsen, Pilsen sem álcool e tipo Malzbier, nas embalagens lata (350 mL) e garrafa âmbar (355 mL). Foram analisadas 5 marcas da cerveja tipo Pilsen (fabricante A, B, C, D e E), 5 marcas da Pilsen sem álcool (fabricante B, F, G, H e I)

e 5 marcas de cerveja tipo Malzbier (A, B, D, F e J) (a marca “J” somente foi encontrada em garrafa). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para o tempo inicial de avaliação (t_0) considerou-se as cervejas com menos de 20 dias de fabricação. Foram analisados três lotes de cada amostra, em triplicata.

A acetonitrila grau cromatográfico e o ácido acético utilizados no estudo foram adquiridos da Merck, Brasil, e o hidróxido de potássio e o acetato de amônio, ACS grau analítico, da Synth.

Os padrões de folatos (5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio, 10-metil-ácido-fólico e 10-formil-ácido-fólico) foram obtidos do Laboratório Dr. Schircks (Jona, Suíça). A água utilizada no preparo dos padrões e da fase móvel foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore).

Todas as amostras, a fase móvel e a acetonitrila foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700 Millipore), com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

2.2. Equipamento e metodologia

Para determinação dos folatos nas amostras de cerveja, baseou-se no método desenvolvido por Rybka e Godoy (2010), utilizando-se uma coluna Vydac, fase reversa, com dp 5 μ m, 150 X 3,2 mm d.i. O cromatógrafo líquido de alta eficiência (Hewlett Packard série 1100 - Agilent) equipado com injetor e degaseificador automáticos e bomba quaternária, foi controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu também o tratamento dos dados. Os detectores de arranjo de diodos (DAD) UV-visível e de fluorescência foram acoplados ao equipamento dispostos em série.

Os padrões de folatos foram diluídos em tampão acetato 0,05M e injetado no cromatógrafo o volume de 20 μ L. Para separar os folatos utilizou-se vazão de 0,5 mL/min de fase móvel (ácido acético glacial 2,0%, pH ajustado em 2,8 com KOH) e acetonitrila, através do sistema de eluição por gradiente. A corrida cromatográfica iniciou-se com 100% de solução aquosa de ácido acético, chegando em 18 minutos a 96% da solução e 4% de acetonitrila. Dos 18 aos 25 minutos seguiu um novo gradiente, sendo finalizada com 70% de solução aquosa de ácido acético e 30% de acetonitrila aos 25 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos, antes da próxima injeção.

A identificação dos folatos foi realizada através dos tempos de retenção, espectros de absorção e co-cromatografia. A detecção do ácido fólico e do 10-metil-ácido fólico foi

realizada com detector de arranjo de diodos ajustado para 290nm; o 5-metiltetraidrofolato e 5-formiltetraidrofolato foram avaliados pelo detector de fluorescência ajustado para λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 360nm. E o 10-formil-ácido fólico em fluorescência a λ_{exc} . 290nm e λ_{emis} . 445nm.

A quantificação dos folatos foi realizada através de curvas de padronização externas, as quais também foram utilizadas na avaliação da faixa de linearidade.

2.2.1. Validação do método

A validação do método foi realizada por Rybka e Godoy (2010).

2.2.2. Avaliação das amostras

Primeiramente, as amostras ficaram por 10 minutos em banho de ultrasson, para degaseificação, sendo em seguida filtradas e injetadas diretamente no cromatógrafo (injeção de 20 μ L). Todas as amostras foram filtradas em membrana 0,45 μ m (Millipore).

As avaliações foram realizadas no “Tempo 0 – t0” (cerveja recém fabricada), “Tempo 2 – t2” (após 2 meses de fabricação), “Tempo 4 – t4” (após 4 meses de fabricação) e “Tempo 6 – t6” (após 6 meses de fabricação); já que grande parte das cervejas possui 6 meses de validade. Durante os meses de armazenamento as amostras foram expostas à luz durante o dia e temperatura ambiente, simulando prateleiras de supermercado.

As latas e garrafas foram abertas no momento da análise, sendo degaseificadas e filtradas no escuro. A temperatura da água no ultrasson foi mantida baixa com adição de gelo. A injeção em cromatógrafo foi realizada logo após o preparo das amostras, ficando os vials no equipamento em ambiente escuro durante as análises realizadas em triplicata.

2.3. Análise Estatística

Na comparação do teor de folatos presentes nas cervejas realizou-se teste estatístico Anova e Tukey, utilizando-se o programa Estatística (versão 7.0), e considerando significativas as diferenças quando $p \leq 0,05$. Para acompanhamento da vida de prateleira das cervejas foram realizados gráficos múltiplos de médias e erros para desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação dos folatos em cervejas

A variação encontrada entre lotes de uma mesma cerveja foi bastante significativa. Os CVs para os lotes das cervejas em lata variaram de 2,08 a 48,62% para o 10-metil ácido fólico, de 10,66 a 52,83% para o 5-metiltetraidrofolato e de 4,92 a 33,18% para o 10-formil ácido fólico. Para a cerveja em garrafa, a variação foi entre 3,80 e 52,42% para o 10-metil ácido fólico, entre 1,77 e 81,31% para o 5-metiltetraidrofolato e entre 5,77 e 36,19% para o 10-formil ácido fólico. O teor de folatos para cada lote encontra-se nos Apêndices 1 ao 6.

A Tabela 1 apresenta as concentrações médias dos folatos em relação aos tipos de cerveja recém fabricadas, considerando latas e garrafas um mesmo grupo. Para este teste estatístico foram utilizadas 9 amostras de cada tipo de cerveja, já que a 5ª marca de Malzbier lata não pode ser encontrada no mercado.

Tabela 1: Concentrações médias dos folatos presentes nas amostras de cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier.

Folato	Tipo de cerveja	Faixa de variação das Concentrações* (µg/100mL)	Concentração Média** (µg/100mL)
10-metil ácido fólico	Pilsen	2,48 – 8,99	6,52 ^b
	Sem álcool	5,33 – 11,36	8,38 ^a
	Malzbier	2,21 – 8,57	5,49 ^c
5-metiltetraidrofolato	Pilsen	4,58 – 17,63	9,66 ^a
	Sem álcool	1,17 – 29,49	6,55 ^b
	Malzbier	2,39 – 18,49	8,44 ^a
10-formil ácido fólico	Pilsen	4,78 – 10,86	7,16 ^a
	Sem álcool	2,57 – 10,83	6,02 ^b
	Malzbier	3,10 – 9,67	6,19 ^b

* Valores representam a faixa de teor de folatos encontrado para as amostras em relação aos tipos de cerveja recém fabricadas (9 marcas de cada tipo), considerando triplicatas de 3 lotes de latas e 3 lotes de garrafas um mesmo grupo.

** Valores são a média do teor de folatos para cada faixa. Para letras iguais não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$) para cada folato.

Na avaliação do tipo de cerveja, independente de marcas ou embalagens, nota-se que não existe um padrão para o teor de folatos existente. O 5-metiltetraidrofolato apresentou teor menor para a cerveja sem álcool, no entanto o 10-metil ácido fólico apresentou valores maiores para a mesma cerveja.

Levando-se em conta a embalagem utilizada para armazenamento, foi realizada uma comparação entre o teor de cada folato analisado em cada tipo de cerveja (Tabela 2). Para esta avaliação não foi considerada a marca “J” de cerveja Malzbier garrafa, afim de possibilitar a aplicação do teste estatístico.

Tabela 2: Concentrações médias ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos em relação ao tipo de embalagem utilizada.

Pilsen									
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico	
RF		6F		RF		6F		RF	6F
L	G	L	G	L	G	L	G	L	G
6,38 ^a	6,55 ^a	3,46 ^b	6,29 ^a	8,02 ^b	11,35 ^a	4,47 ^b	6,22 ^a	7,10 ^a	7,39 ^a
								5,63 ^a	5,89 ^a
Sem Álcool									
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico	
RF		6F		RF		6F		RF	6F
L	G	L	G	L	G	L	G	L	G
8,13 ^a	8,19 ^a	6,17 ^a	6,53 ^a	3,78 ^b	9,47 ^a	2,43 ^b	6,56 ^a	6,53 ^a	5,22 ^b
								5,28 ^a	4,21 ^b
Malzbier									
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico	
RF		6F		RF		6F		RF	6F
L	G	L	G	L	G	L	G	L	G
5,23 ^a	5,76 ^a	5,13 ^a	5,21 ^a	7,45 ^b	10,50 ^a	4,61 ^b	8,12 ^a	6,39 ^a	6,65 ^a
								6,45 ^a	5,75 ^a

*Letras iguais: não há diferença significativa nas amostras ($p>0,05$) entre lata e garrafa para o mesmo folato em um mesmo tempo de fabricação. Consideradas para cálculo 5 marcas de cerveja Pilsen, 5 marcas de cerveja sem álcool e 4 marcas de cerveja Malzbier. RF: recém fabricadas; 6F: após 6 meses de fabricação; L- lata; G- garrafa.

Pode-se notar que tanto no início, quanto ao final da vida de prateleira das amostras, a proporcionalidade entre cada folato nas embalagens se manteve (exceto para o 10-metil ácido fólico na cerveja Pilsen).

O 10-metil ácido fólico apresentou teor semelhante independente do tipo de embalagem, no início e ao final da vida de prateleira para as cervejas sem álcool e Malzbier; enquanto que o 5-metiltetraidrofolato apresentou maior teor quando acondicionado em garrafas âmbar.

A concentração de 10-formil ácido fólico não apresentou diferenças significativas entre as duas embalagens para a cerveja Pilsen e Malzbier, possuindo menor teor em garrafa quando avaliado na cerveja sem álcool.

As tabelas a seguir comparam as concentrações médias dos folatos em cada marca para a cerveja recém fabricada do tipo Pilsen (Tabela 3), do tipo sem álcool

(Tabela 4) e do tipo Malzbier (Tabela 5), e respectivamente, o teor encontrado em cada análise está apresentado nos apêndices 1 e 4, 2 e 5, e 3 e 6.

Tabela 3: Concentrações médias dos folatos entre marcas para a cerveja do tipo Pilsen.

10-metil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	2,48 – 8,52	6,03 ^{ab}	A	5,78 – 8,21	6,98 ^{ab}
B	6,46 – 8,99	8,08 ^a	B	5,99 – 6,12	6,04 ^b
C	4,85 – 7,09	5,80 ^b	C	4,78 – 6,99	6,14 ^b
D	3,17 – 6,27	5,02 ^b	D	5,32 – 6,82	5,92 ^b
E	6,02 – 8,35	6,93 ^{ab}	E	4,59 – 7,93	7,68 ^a
5-metiltetraidrofolato (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	4,58 – 6,65	5,41 ^c	A	4,60 – 11,01	8,39 ^b
B	7,02 – 8,19	7,51 ^b	B	15,41 – 15,58	15,51 ^a
C	4,65 – 8,08	6,74 ^{bc}	C	6,25 – 9,46	8,20 ^b
D	6,79 – 9,75	8,20 ^b	D	8,96 – 10,84	9,87 ^b
E	11,54 – 12,90	12,24 ^a	E	9,90 – 17,63	14,78 ^a
10-formil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	5,21 – 9,92	7,07 ^{ab}	A	4,78 – 6,22	5,69 ^b
B	6,57 – 7,41	6,90 ^{ab}	B	5,55 – 10,34	7,22 ^b
C	5,28 – 6,93	6,17 ^b	C	5,75 – 7,38	6,74 ^b
D	5,61 – 9,23	7,29 ^{ab}	D	6,27 – 7,34	6,92 ^b
E	7,03 – 9,11	8,07 ^a	E	9,65 – 10,86	10,41 ^a

* Valores representam a faixa de teor entre lotes de folatos encontrado para as amostras em relação à cada marca de cerveja recém fabricada.

** Valores são a média do teor de folatos para cada faixa. Letras iguais, para cada folato, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa (p>0,05).

Tabela 4: Concentrações médias dos folatos entre marcas para a cerveja do tipo Pilsen sem álcool.

10-metil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
G	10,87 – 11,36	11,11 ^a	G	7,06 – 11,02	9,62 ^a
B	9,57 – 9,69	9,66 ^b	B	10,15 – 10,78	10,39 ^a
H	5,33 – 6,32	5,92 ^d	H	5,96 – 6,47	6,16 ^c
I	6,93 – 7,32	7,11 ^c	I	6,75 – 7,50	7,11 ^{bc}
F	6,20 – 7,47	6,88 ^c	F	6,72 – 8,24	7,69 ^b
5-metiltetraidrofolato (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
G	8,10 – 8,66	8,37 ^a	G	8,06 – 10,71	9,79 ^b
B	2,85 – 4,57	3,93 ^b	B	16,64 – 29,49	21,08 ^a
H	1,58 – 2,21	1,64 ^c	H	6,20 – 7,93	7,24 ^{bc}
I	1,17 – 1,97	1,58 ^c	I	2,33 – 6,04	4,64 ^c
F	2,60 – 3,76	3,36 ^b	F	3,00 – 7,30	4,61 ^c
10-formil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
G	8,25 – 9,66	9,12 ^a	G	6,61 – 8,16	7,21 ^a
B	8,41 – 10,83	9,60 ^a	B	6,33 – 7,98	6,88 ^a
H	3,58 – 5,49	4,76 ^b	H	2,57 – 3,53	2,99 ^c
I	4,37 – 5,10	4,65 ^b	I	3,47 – 4,89	4,18 ^b
F	4,33 – 4,72	4,54 ^b	F	4,01 – 6,35	4,84 ^b

* Valores representam a faixa de teor entre lotes de folatos encontrado para as amostras em relação à cada marca de cerveja recém fabricada.

** Valores são a média do teor de folatos para cada faixa. Letras iguais, para cada folato, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa (p>0,05).

Tabela 5: Concentrações médias dos folatos entre marcas para a cerveja do tipo Malzbier.

10-metil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	4,08 – 6,30	5,12 ^a	A	2,21 – 7,49	4,50 ^b
B	2,40 – 8,57	5,95 ^a	B	5,27 – 5,50	5,44 ^{ab}
F	4,34 – 5,81	5,14 ^a	F	5,21 – 7,56	6,33 ^a
D	2,93 – 5,89	4,70 ^a	D	6,46 – 7,11	6,79 ^a
J	-	-	J	5,05 – 6,22	5,53 ^{ab}
5-metiltetraidrofolato (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	2,39 – 6,28	4,81 ^b	A	4,38 – 13,72	7,87 ^{cd}
B	3,74 – 13,25	8,15 ^{ab}	B	8,33 – 9,48	8,73 ^{bc}
F	7,80 – 10,13	9,05 ^a	F	11,64 – 14,44	12,90 ^a
D	7,17 – 9,82	7,78 ^{ab}	D	9,20 – 18,49	12,49 ^{ab}
J	-	-	J	3,80 – 4,40	4,18 ^d
10-formil ácido fólico (µg/100mL)					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	3,39 – 6,58	5,49 ^b	A	5,27 – 6,35	5,80 ^b
B	3,46 – 5,71	4,78 ^b	B	4,07 – 6,33	4,84 ^{bc}
F	5,84 – 9,67	7,72 ^a	F	6,41 – 9,21	8,21 ^a
D	5,44 – 8,92	7,56 ^a	D	6,38 – 8,97	7,78 ^a
J	-	-	J	3,10 – 3,97	3,56 ^c

* Valores representam a faixa de teor entre lotes de folatos encontrado para as amostras em relação à cada marca de cerveja recém fabricada.

** Valores são a média do teor de folatos para cada faixa. Letras iguais, para cada folato, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa (p>0,05).

Nota-se uma considerável variação entre o teor dos folatos analisados nas diferentes marcas, tanto para acondicionamento em garrafas quanto em latas. Este fato se deve às diferentes matérias primas utilizadas pelas indústrias e aos diferentes processos de fabricação, principalmente a fermentação da cerveja.

Por se tratarem de fontes vegetais, as matérias prima das cervejas possuem composição bastante variada, que provavelmente se deve às diferentes condições edafoclimáticas ocorridas durante o plantio, já que a síntese de folatos pelos vegetais é bastante influenciada por fatores como luz e composição do solo. E ainda, sabendo-se que a fermentação aumenta a quantidade de folatos ao final do processo, também é possível que os fabricantes de cerveja utilizem a fermentação a temperaturas, quantidade de leveduras e por tempos diferentes. Patring (2007) obteve resultados bastante diferentes para teor de folatos entre diferentes grupos de leveduras.

Owens et al. (2007) encontraram teor de 5-metiltetraidrofolato em cervejas variando de não detectável a 4,6 µg/100mL (Pale ale americana), valor próximo ao apresentado por algumas cervejas analisadas. Mas assim como no presente estudo, os pesquisadores encontraram valores bastante variáveis entre si para diferentes cervejas.

As análises realizadas nesta pesquisa para cerveja recém fabricada, resultaram em 23,99, 21,18 e 18,26 µg/100mL de folatos totais para a cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier garrafa, respectivamente. Para as cervejas em lata, os folatos totais encontrados na cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier, respectivamente, foram de 22,86, 19,56 e 19,93 µg/100mL.

Walker et al. (2001, 2003 apud Owens et al., 2007) relataram valores de folatos em cervejas variando entre 4,7 e 12,5 µg/100mL, enquanto Pietercelie et al. (2003) afirmaram que nas cervejas belgas refermentadas o teor variou de 5,0 a 20,0 µg/100mL. Os últimos autores chamaram a atenção para a grande variabilidade entre os níveis medidos em amostras da mesma cerveja. Savage et al. (1995) relataram valores de folatos totais analisados por um ensaio de quimioluminescência em cervejas caseiras e comerciais do Zimbábue, e cervejas européias, entre outras bebidas. O conteúdo de folatos na cerveja caseira foi cerca de 11,0 µg/100mL, enquanto as cervejas comerciais tiveram o índice total de folatos variando de 5,2 a 32,8 µg/100mL. As cervejas européias tiveram teor de folatos entre 3,0 e 6,4 µg/100mL.

Os níveis de folatos totais entre tipos de cerveja encontrados neste estudo nas cervejas recém fabricadas variaram de 18,26 a 23,99 µg/100mL, sem a utilização de

ensaios enzimáticos ou microbiológicos, demonstrando que as cervejas brasileiras possuem alto teor de folatos, e que a própria fermentação do produto pode liberar grande quantidade da vitamina, enquanto uma extração mais demorada pode vir a causar perdas da mesma.

As Figuras 1 e 2 apresentam gráficos representando a variação no teor de folatos durante a vida de prateleira da cerveja, sendo medidos quando recém fabricadas (t_0), após 2 meses de fabricação (t_2), após 4 meses de fabricação (t_4) e após 6 meses de fabricação (t_6). Cada gráfico demonstra a variação de cada folato nas 5 marcas de cerveja avaliadas para cada tipo da bebida.

A Tabela 6 mostra o teor de folatos e a análise estatística ($p>0,05$) entre os tempos 0 e 6 de cada tipo de cerveja, em cada embalagem, para cada folato. Comparando-se as Figuras 1 e 2 com a Tabela 6. Pode-se notar que apesar de haver diferença estatística entre o teor de folatos das cervejas recém fabricadas e após 6 meses de vida de prateleira, não é possível obter um perfil para o comportamento de cada folato. De modo geral, pode-se concluir que o 10-metil ácido fólico parece ser o folato mais estável ao longo do tempo, principalmente na cerveja Malzbier, e que o 5-metiltetraidrofolato possui indicações de ser o mais instável, tendo apresentado maiores variações em seu teor.

Da mesma forma, não se pode afirmar que uma embalagem ou outra possua maior capacidade de proteção contra a degradação dos folatos. Apesar de o 5-metiltetraidrofolato apresentar menor teor em lata logo que a cerveja chega ao mercado, tanto em lata quanto em garrafa ocorre queda de seu teor com diferença estatística. O 10-formil ácido fólico apresenta indícios de ser ligeiramente mais estável quando armazenado em lata, especialmente na cerveja Malzbier.

Tabela 6: Concentrações (µg/100mL) médias dos folatos em cervejas recém fabricadas e após 6 meses de fabricação.

Pilsen											
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico			
G		L		G		L		G		L	
RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F
6,55 ^a	6,29 ^a	6,38 ^a	3,46 ^b	11,35 ^a	6,22 ^b	8,02 ^a	4,47 ^b	7,39 ^a	5,89 ^b	7,10 ^a	5,63 ^b
Sem Álcool											
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico			
G		L		G		L		G		L	
RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F
8,19 ^a	6,53 ^b	8,13 ^a	6,17 ^b	9,47 ^a	6,56 ^b	3,78 ^a	2,43 ^b	5,22 ^a	4,21 ^b	6,53 ^a	5,28 ^b
Malzbier											
10-metil ácido fólico				5-metiltetraidrofolato				10-formil ácido fólico			
G		L		G		L		G		L	
RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F	RF	6F
5,72 ^a	5,22 ^a	5,23 ^a	5,13 ^a	9,24 ^a	7,31 ^b	7,45 ^a	4,61 ^b	6,04 ^a	5,18 ^b	6,39 ^a	6,45 ^a

*Letras iguais: não há diferença significativa nas amostras ($p>0,05$) recém fabricadas (RF) e após 6 meses de fabricação(6F) para cada uma das embalagens. L - lata; G - garrafa.

A marca “B” de cerveja sem álcool em garrafa contém nitidamente maior teor de 5-metiltetraidrofolato do que todas as outras analisadas, mesmo após 6 meses de armazenamento, assim como a marca “J” de cerveja Malzbier possui menor teor deste folato. No entanto, quando a marca “B” sem álcool é analisada para esta forma da vitamina na embalagem lata, o teor aparece bastante baixo, assim como a maioria das marcas em cerveja sem álcool.

Para a cerveja armazenada em garrafa, o 5-metiltetraidrofolato parece ser o folato com maiores variações entre as marcas. Enquanto que para a cerveja armazenada em lata tanto o 5-metiltetraidrofolato quanto o 10-formil ácido fólico apresentaram teor diferente entre as amostras.

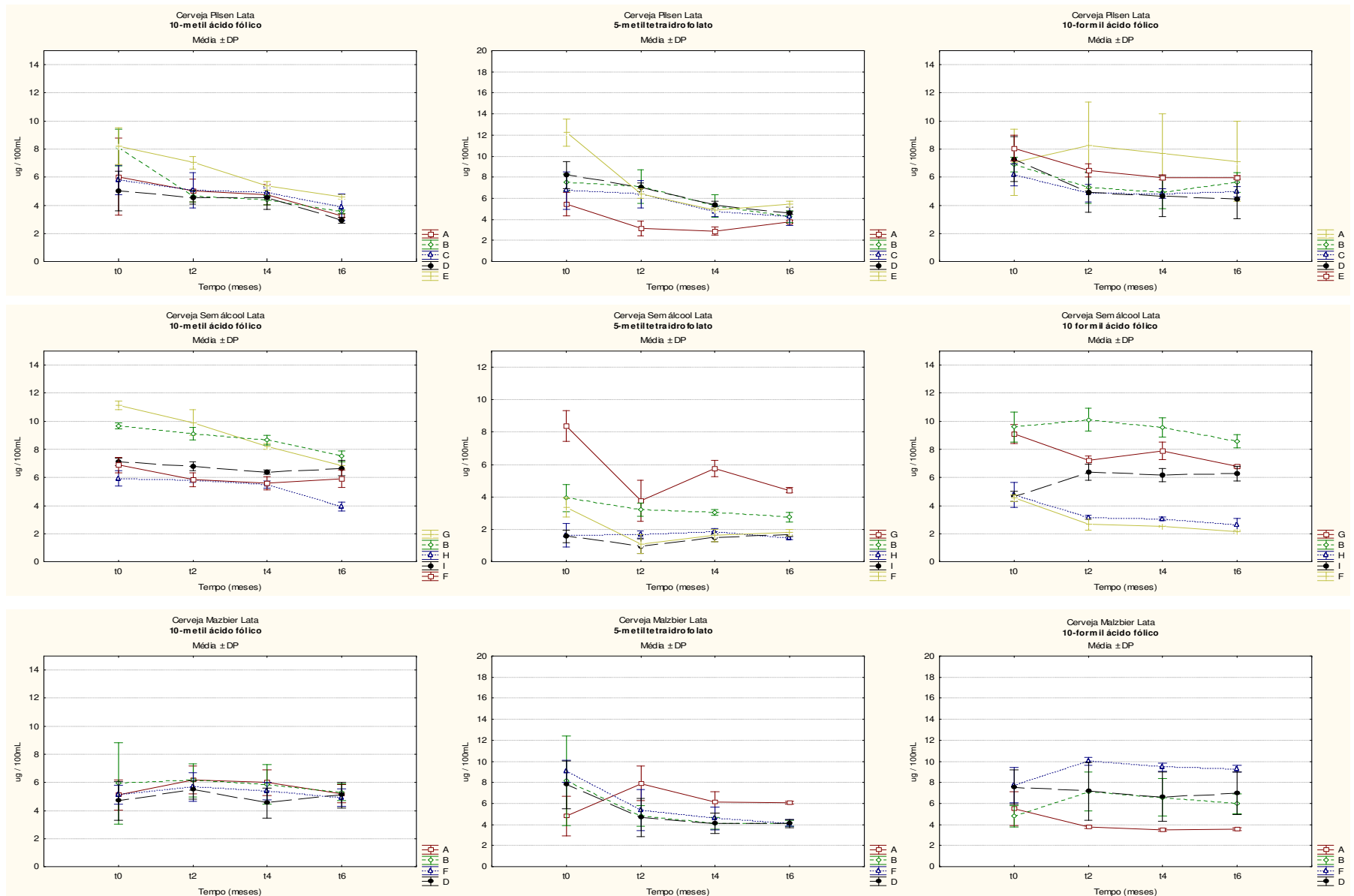


Figura 1: Vida de prateleira das cervejas em lata. t0 – Recém fabricada; t2 – 2 meses de fabricação; t4 – 4 meses de fabricação; t6 – 6 meses de fabricação. Letras em maiúsculo representam as marcas.

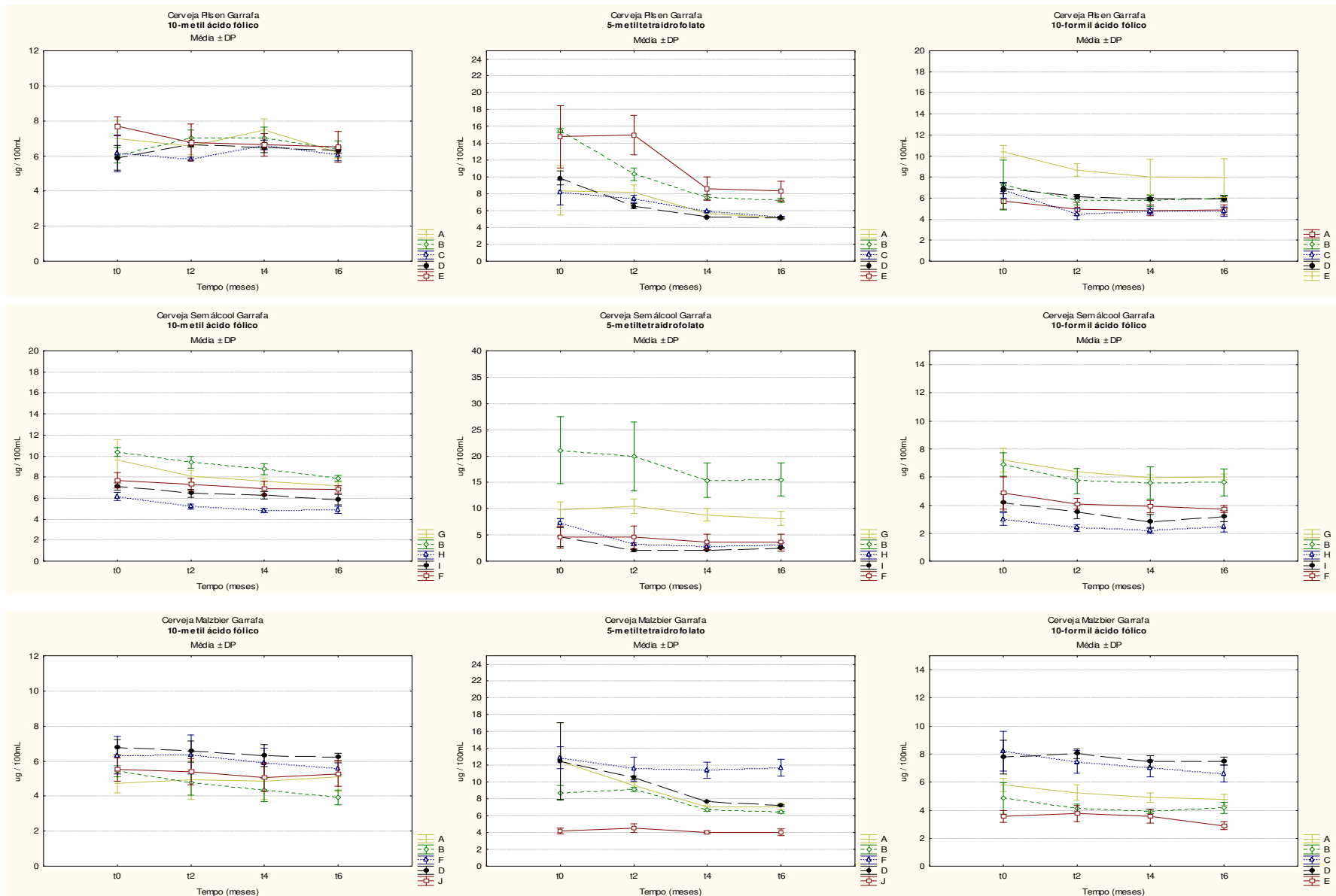


Figura 2: Vida de prateleira das cervejas em garrafa. t0 – Recém fabricada; t2 – 2 meses de fabricação; t4 – 4 meses de fabricação; t6 – 6 meses de fabricação. Letras em maiúsculo representam as marcas.

4. Conclusões

Os folatos 10-metil ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato e 10-formil ácido fólico foram encontrados em todas as cervejas analisadas, embora haja grande variação na concentração das formas da vitamina entre lotes de uma mesma amostra.

O teor de folatos em cervejas decai ao longo da vida de prateleira da bebida, mas esta redução não é dependente do tipo de embalagem utilizada. De modo geral, o 10-metil ácido fólico parece ser o folato mais estável ao longo do tempo, principalmente na cerveja Malzbier, e o 5-metiltetraidrofolato possui indicações de ser o mais instável, tendo apresentado maiores variações em seu teor.

Os níveis de folatos totais encontrados em 100 mL nas cervejas recém fabricadas foram equivalentes a cerca de 10% dos níveis recomendados para homens e mulheres adultos, podendo ser considerada um alimento auxiliar à ingestão diária recomendada de folatos se consumida com moderação. A cerveja sem álcool apresentou teor de folatos totais similar às cervejas alcoólicas, podendo ser ingerida por gestantes quando completamente livre de álcool, e prevenindo defeitos de formação na gestação.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

6. Referências Bibliográficas

ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 544-546, 2000.

ARCOT, J.; WOOTTON, M.; ALURY, S.; CHAN, H.Y.; SHRESTHA, A.K. Folate levels in twelve Australian wheats and changes during processing into bread. **Food Australia**, n.54, p.18-20, 2002.

BJORKLUND N. K., GORDON R., A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. **International Journal of Developmental Biology**, v. 50, P. 135-141, 2006.

BLOUNT B. C., MACK M. M., WEHR C. M., MACGREGOR J. T., HIATT R. A., WANG G., WICKRAMASINGHE S. N., EVERSON R. B., AMES B. N.; Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.**, v. 94, p. 3290-3295, 1997.

BOUSHEY C. J., BERESFORD S. A., OMMENN G. S., MOTULSKY A. G., A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. **The Journal of the American Medical Association**, v. 274, p.1049-1057. 1995.

de BREE, A., Van DUSSELDORP, M., BROUWER, I. A., Van Het HOF, K. H., STEEGERSTHEUNISSEN, R. P. M., Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 643-660, 1997.

BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L. J. **Handbook of Vitamins**. 2 ed Rev. and Expanded, New York: Marcel Decker, 1991, p 453-490.

BROUWER V, STOROZHENKO S., VAN DE STEENE J. C., WILLE S. M. R., STOVE C. P., VAN DER STRAETEN D., LAMBERT W. E., Optimisation and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for folates in rice. **Journal of Chromatography A**, v.1215, p.125-132, 2008.

CRITTENDEN, R.G.; MARTINEZ, N.R.; PLAUNE, M.J., Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n.80, p.217– 222, 2002.

DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Defunciones totales por sexo: 20 principales causas. 1996-2001. Bogotá, 2001.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1997, 1007p.

EITTENMILLER, R.R., LANDEN Jr, W. O., AUGUSTIN, J., in: S.S. Nielsen (ed.), **Food Analysis**, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, cap18, 1998. 284 p.

ESKES T. K. A. B., Folate and the fetus, **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.71, p. 105–111. 1997

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.

GRAVINA-TADDEI C. F., BATLOUNI M., SARTESCHI C., BALTAR V. T., SALVARINI N. A. C., BERTOLAMI M. C., SOUSA, J. E. M. R., Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 85, p. 166-73. 2005.

JACQUES, P. F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A. G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 19, p. 1449-1454, 1999.

JÄGERSTAD, M., PIIRONEN, V., WALKER, C., ROS, G., CARNOVALE, E., HOLASOVA, M., NAU, H., Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 298-306, 2005.

KATZUNG B. G. **Farmacologia básica e clínica**, 5ed, São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.

KARILUOTO, S., VAHTERISTO, L., SALOVAARA, H., KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., PIIRONEN, V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 134-139, 2004.

KARILUOTO, S., AITTAMAA, M., KORHOLA, M., SALOVAARA, H., VAHTERISTO, L., PIIRONEN, V., Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 137-143, 2006.

KIM, Y. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 66-88, 1999.

LUCOCK M. Z., YATES, Z., GLAVILLE, T., LEEMING, R., SIMPSON, N., DASKALAKIS, I., A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. **Nutrition Research**, v. 23, n.11, p. 1463-1475, 2003.

MALINOW, M.R., DUELL P. B., HESS D. L., ANDERSON P. H., FRUGER W. D., PHILLIPSON B. E., GLUCKMAN R. A., BLOCK P. C., UPSON B. M. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **The New England Journal of Medicine**, v.338, n.15, p.1009-1015, 1998.

MAYER O. JR, SIMON J, ROSOLOVÁ H., A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations, **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 605-609, 2001.

OWENS J E., CLIFFORD A. J., BAMFORTH C. W. Folate in Beer. **Journal of the The Institute of Brewing**, v. 113, n.3, p. 243–248, 2007.

OSSEYI, E. S., EWHLING, R. L., ALBRECHT, J. A., HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 375-378, 2001.

PAZ, R., NAVARRO, H. F., Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico - Recomendaciones terapéuticas, **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 113-119, 2006.

PATRING J. **Development and Validation of Chromatographic Methods to Study Folate Derivatives Produced by Yeasts**. 2007, 65p, Tese (Doutor em fontes naturais e ciência da agricultura), Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science. Uppsala, 2007.

PIETERCELIE, A., MICHAUX, V., BREVARD, M. A., DEBOURG, A., Refermented beers: an interesting source of folate. **Proceedings of the European Brewery Convention Congress**, Dublin, IRL Press: Oxford, p. 1366–1374. 2003.

RIBANI M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ, L.C., CAMPANA, A.M.G., BARRERO, F.A., LINARES, C.J., CEBA, M.R. Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 2, p. 471-476, 1995.

RYBKA A. C. P, GODOY, H. T. Validação de método para detecção de folatos livres em cervejas. A ser enviado para **Química Nova**. 2010.

SAVAGE, D. G., GANGAIDZO, I. T., BENNIE, A., Abundant folate in Zimbabwean beer. [Letter] **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.19, p. 1596. 1995.

SCHNYDER G., ROFFI M., FLAMMER Y., Effect of homocysteine – lowering therapy with folic - acid, vitamin B(12), and Vitamin B(6) on clinical outcome after percutaneous coronary. Intervention: the Swiss Herat study a randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**. v.288, p.973-979. 2002.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review; Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 795-824, 2000.

SELHUB J., JAKES P. F., WILSON P., RUSH D., ROSENBERG I. H., Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **The Journal of the American Medical Association**. v. 270, p. 2693-2698. 1993

SELHUB J., ROSENBERG I.H. Folic Acid. In **Present Knowledge in Nutrition** (7th edition), , Edited by Ziegler E.E. & Filer Jr. L.J., International Life Science Institute, Washington, D.C., chapter 21, 1996, p 206–219.

SEYOUM E., SELHUB J., Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action, **Journal of Nutrition**, v.128, p. 195-196. 1998.

SILVA, E. R; DELLA LUCIA, C. M; OLIVEIRA, D. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M; REIS, B.D.L; LOBATO, A. L. Otimização de metodologia para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência, 2009.

TRUMBO, P. R. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin and provitamin A carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 379-382, 2003.

WALD D. S., LAW M., MORRIS J. K., Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 325, p.1202. 2002.

WALKER, C. J., HERRMANN, M., FAULKNER, A., BACK, W., Investigations on the folate (Vitamin B9) content of Bavarian wheat beers. **Proceedings of the European Brewery Convention Congress**, Dublin, IRL Press: Oxford, p. 1358–1365. 2003.

WALKER, C. J., PATEL, D., WOLFE, C., WRIGHT, A., FINGLAS, P., Folate in beer and the prevention of cardiovascular disease. **Proceedings of the European Brewery Convention Congress** Budapest, Fachverlag. Hans Carl: Nürnberg, Germany, CD ROM. p. 69–77. 2001.

ZANINI A. C.; OGA S. **Farmacologia aplicada**. 5ª ed, São Paulo: Atheneu, 1994. 739p.

Capítulo 4

Fenólicos totais e capacidade antioxidante em cervejas brasileiras

Ana Cecília P. Rybka, Vívian C. Bochi, Daniele Rodrigues e Helena T. Godoy^{*}
Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

^{*} helena@fea.unicamp.br

RESUMO

Compostos fenólicos são substâncias presentes naturalmente nos vegetais, podendo atuar como antioxidantes. Na cerveja desempenham um papel importante nas características sensoriais e nutricionais; sendo provenientes do malte e do lúpulo possuem propriedades em relação a quimio-prevenção do câncer, efeitos cardioprotetores, propriedades antiinflamatórias, estimulantes do sistema imunológico, antialérgicas, antivirais e antibactericidas. Existem muitos ensaios praticados para avaliação da capacidade antioxidante, cada um deles com mecanismos de reação diferentes sendo indicado para matrizes alimentares e tipos de antioxidantes diversos. Geralmente é utilizada a combinação de métodos de avaliação para informações mais completas. Este estudo teve como objetivo conhecer o teor de fenólicos totais das cervejas brasileiras, assim como a capacidade antioxidante, em diferentes marcas, embalagens e tipos da bebida. Os fenólicos totais foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu, através do qual foram encontrados 47,05, 18,67 e 21,83 mg/100mL em equivalentes de ácido gálico (EAG), na cerveja Malzbier, Pilsen sem álcool e Pilsen, respectivamente. O tipo de embalagem utilizada, lata ou garrafa, apresentou relevância para o teor de fenólicos totais somente para a cerveja Pilsen. A cerveja sem álcool foi a que mais apresentou variação de teor entre marcas. Para avaliação da capacidade antioxidante foram realizados dois ensaios, do radical 2,2- difenil -1- picrilhidrazil (DPPH) e poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). O primeiro indicou a cerveja Malzbier como o tipo de cerveja com maior capacidade antioxidante 76,6 $\mu\text{mol EAG/ 100mL}$ (comparado a 33,1 e 30,8 $\mu\text{mol EAG/ 100mL}$ das cervejas sem álcool e Pilsen, respectivamente), corroborando com o teor de fenólicos totais e com a capacidade antioxidante avaliada através do ensaio FRAP, que apresentou 46,4, 34,5 e 115,8 $\mu\text{mol EAG/ 100mL}$, para as cervejas Pilsen, sem álcool e Malzbier respectivamente.

Palavras-chave: Cerveja, compostos fenólicos totais, DPPH, FRAP, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Phenolic compounds are substances naturally present in plants that may act as antioxidants. In beer, they play an important role in the sensory characteristics and nutritional status. They are derived from malt and hops, and had properties as cancer chemo-prevention, cardioprotective, anti-inflammatory properties, immune system stimulating, antiallergic, antiviral and antibacterial. There are many tests performed to evaluate the antioxidant capacity, each one with different reaction mechanisms and indicated for food matrices and different types of antioxidants. It is often used a combination of assessment methods for further information. This study aimed to determine the total phenolic content of Brazilian beers, as well as the antioxidant capacity in different brands, types and packaging of the drink. The total phenolic content were evaluated by the Folin-Ciocalteu method by which were found 47.05, 18.67 and 21.83 mg/100mL in gallic acid equivalents (GAE) for Malzbier beer, alcohol-free Pilsen and Pilsen, respectively. The type of packaging used, can or bottle, had relevance to the total phenolic content only for the Pilsen beer, and nonalcoholic beer showed the highest variation between brands. To evaluate the antioxidant capacity were applied two methods, DPPH and FRAP. The first one indicated Malzbier as the type of beer with a higher antioxidant capacity GAE 76.6 μmol / 100 mL (compared with 33.1 and 30.8 μmol GAE / 100mL of non-alcoholic beers and Pilsen, respectively), which agrees with the total phenolics content and with the antioxidant capacity evaluated by FRAP assay, which showed 46.4, 34.5 and 115.8 μmol EAG/ 100mL for Pilsen, non alcoholic and Malzbier beer respectively.

Keywords: Beer, total phenolic compounds, DPPH, FRAP, antioxidant capacity.

1. Introdução

Compostos com atividade antioxidante são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. Os compostos fenólicos, tais como os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e os flavonóides, destacam-se neste sentido (Chen et al., 1998; Ewald et al., 1999; Sousa et al., 2007). Suas propriedades de óxido-redução podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (Fennema, 1993; Brenna e Pagliarini, 2001; Zheng e Wang, 2001), cuja formação é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias, aliado à função protetora da membrana celular (Birch et al., 2001; Brenna e Agliarini, 2001; Zheng e Wang, 2001; Wang e Zheng, 2001; Sellapan, Akoh e Krewer, 2002; Yildirim, Mavi e Kara, 2002).

Atuando na inibição em fases do ciclo celular, proliferação celular, estresse oxidativo, indução na desintoxicação das enzimas e ativação do sistema imunológico, estão relacionados à quimio-prevenção do câncer (Martinez-Flores et al., 2002), bem como previnem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade para a formação aterogênica, através da diminuição da adesão e agregação de plaquetas e propriedades vasodilatadoras agindo como cardioprotetores (Martinez-Flores et al., 2002; Yao et al., 2004). Ainda, possuem propriedades antiinflamatórias (Pathak et al., 1991), estimulantes do sistema imunológico, anti-alérgicas, anti-virais e anti-bacterianas (Middleton e Kandaswami, 1992).

Baseados em sua ingestão diária, que em muito excede o de outros antioxidantes, (vitamina E, vitamina C, β -caroteno), os compostos fenólicos podem ser um fator importante para garantir o potencial antioxidante da dieta e podem contribuir para manter o equilíbrio oxidativo endógeno em seres humanos (Nardini et al., 2005).

Fantozzi et al. (1998) afirmam que tanto os ácidos fenólicos como os polifenóis estão presentes na cerveja. Os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos na dieta, principalmente em frutas, vegetais, café, vinho, cerveja e azeite (Hermann, 1989; Clifford, 1999; Hermann, 1989) e sua ingestão média tem sido relatada como da ordem de 200 mg/dia, dependendo dos hábitos e preferências alimentares (Scalbert e Williamson, 2000).

A maioria dos polifenóis da cerveja é proveniente do malte e o do lúpulo (Gromus e Lustig, 1998). Devido às propriedades específicas, os polifenóis podem ser

interessantes tecnológica e/ou fisiologicamente (Hough et al., 1981, Gasbarrini et al., 1998). Estão envolvidos na manutenção da espuma, estabilidade física e química e vida de prateleira (Hough et al., 1981; Moll, 1987), sendo importantes para os cervejeiros, devido a sua influência na estabilidade coloidal da bebida, sendo responsável pela turbidez originada pela interação com suas proteínas. Portanto, investigar os compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cervejas comerciais é extremamente interessante na compreensão da estabilidade do sabor da cerveja (Zhao et al., 2010).

Os compostos fenólicos podem ser encontrados em sua forma livre ou, mais freqüentemente, ligados a outros compostos, como ésteres e glicosídeos. Polifenóis derivados de ácidos hidrobenczoicos (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido siríngico) e ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido caféico) são principalmente extraídos do malte, enquanto que os flavonóis (quercetina, canferol), chalconas (xanthohumol) e flavanonas (isoxanthohumol e prenilnaringenina) são encontrados no lúpulo. Catequinas e procianidinas de diversos graus de polimerização (Gonzales San José, Muniz Rodrigues e Vall Bellés, 2001; Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002) são igualmente encontradas no malte e no lúpulo (Montanari et al., 1999; Gorinstein et al., 2000; Freitas et al., 2006; Siqueira et al., 2008).

Os estudos de Lu et al. (2007) e Zhao et al. (2008) demonstraram que o perfil de compostos fenólicos e atividade antioxidante de cevada variou consideravelmente entre as variedades e durante a fabricação da cerveja. Assim, as diferenças entre matérias-primas e processo de fermentação levaria a diferenças significativas no perfil fenólico e atividade antioxidante da cerveja. Além disso, existem controvérsias entre a relevância de compostos fenólicos e atividade antioxidante de cerveja (Vanderhaegen et al., 2006).

No estudo de Nardini et al. (2006), foi demonstrado um aumento significativo nos níveis de ácidos fenólicos livres e conjugados no plasma humano após a administração da cerveja, com pico de absorção máxima em 30 minutos. Segundo os pesquisadores, a rápida absorção de ácidos fenólicos indica que provavelmente esta ocorra na parte proximal do intestino, e devido à presença de formas livres e ligadas de ácidos fenólicos na cerveja, os ácidos fenólicos no plasma podem ser derivados da absorção direta das formas livres presentes na bebida, assim como pela hidrólise in vivo das formas ligadas.

No entanto, para medir a capacidade antioxidante de compostos naturalmente presentes em alimentos, não há ainda um método padrão. Vários ensaios vêm sendo utilizados para avaliar a capacidade antioxidante, nos quais alguns determinam a habilidade dos antioxidantes para seqüestrar radicais livres gerados no meio, outros

avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação. Por causa da variedade de mecanismos e locais de atuação é difícil definir qual o melhor método a ser empregado. Isso tem dificultado a comparação de resultados entre estudos (Campos et al., 2008). Dentre esses métodos, FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro e DPPH (2,2- difenil -1- picrilhidrazil) são alguns dos mais usados atualmente (Pérez-Jiménez e Sauracalixto, 2006), assim como a determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) utilizando o reagente de Folin.

Dentre os métodos pode-se citar aqueles que medem a habilidade de um antioxidante em reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron, como por exemplo o ensaio do DPPH (Figura 1). Esse método baseia-se na habilidade do antioxidante de seqüestrar o radical escolhido e impedir a reação do radical com o substrato. A avaliação da reação é feita por meio da medida da variação da absorbância característica do próprio radical (Brand-Willians et al., 1995; Huang, Ou e Prior, 2005).

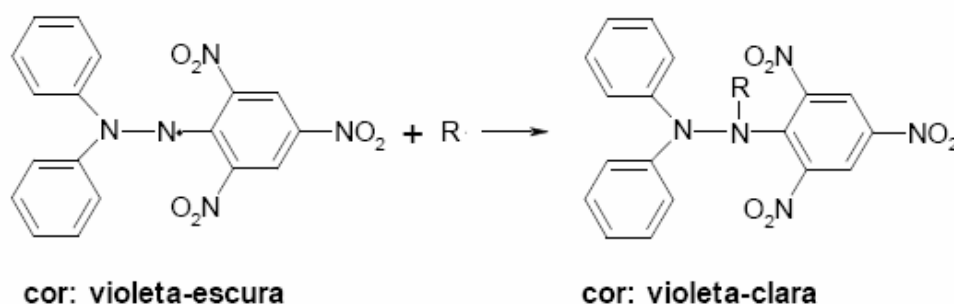


Figura 1: Estabilização do radical livre DPPH (Rufino et al., 2007).

A medida da absorbância é usada como parâmetro também no teste de poder redutor e capacidade quelante de íons ferrosos (Santos, 2007). Benzie e Strain (1996) descrevem o método FRAP (Figura 2) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (Rufino et al., 2006).

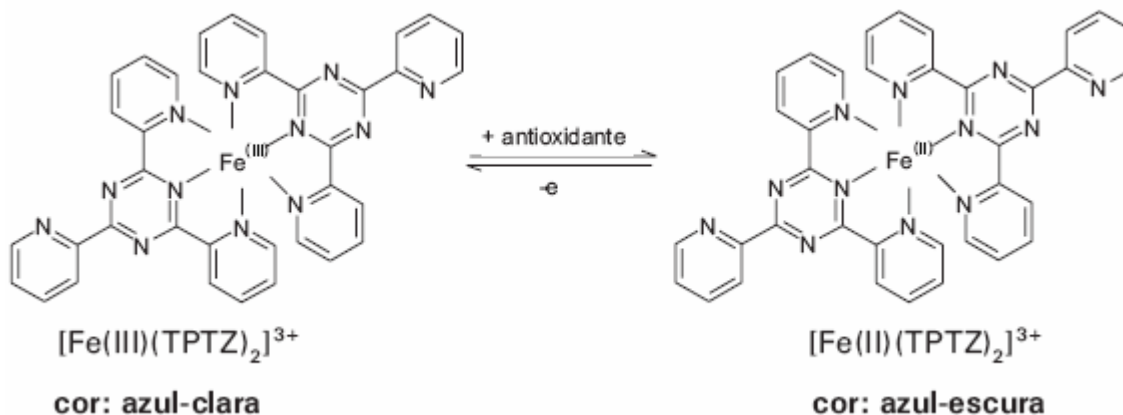


Figura 2: Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} (Rufino et al., 2006).

Pode-se também avaliar o teor de compostos fenólicos totais, através da metodologia descrita por Singleton et al. (1999), com o reagente Folin-Ciocalteu, que contém tungstato de sódio, e ácido fosfomolibdico no estágio mais alto de oxidação.

No sentido de avaliar a capacidade antioxidante de cervejas Pilsen, sem álcool e Malzbier, este trabalho pretendeu aplicar dois conhecidos ensaios de capacidade antioxidante, e investigar o teor de compostos fenólicos totais em cervejas brasileiras.

2. Materiais e Método

2.1. Materiais

Analizou-se 5 marcas de cerveja tipo Pilsen (fabricante A, B, C, D e E), 5 marcas de cerveja Pilsen sem álcool (fabricante B, F, G, H e I) e 5 marcas de cerveja tipo Malzbier (A, B, D, F e J) em lata de 350 mL e garrafa âmbar de 355 mL (exceto marca J). As amostras foram compostas por três lotes de cada cerveja. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A solução etanólica (4,5%) foi preparada utilizando etanol grau analítico marca Qhemis. Os reagentes 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}) e TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, assim como os padrões ácido gálico, Trolox e ácido ascórbico.

Os reagentes acetato de sódio triidratado, ácido acético glacial, ácido clorídrico e cloreto de ferro foram obtidos do fabricante Sinth e o metanol da Ecibra. Na avaliação de

fenólicos totais utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu marca Dinâmica e carbonato de cálcio Sinth. A água empregada nas análises foi filtrada no sistema MILLI-Q da Millipore.

2.2. Equipamento e metodologia

Foram aplicados 2 métodos comumente empregados nas análises da capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) e um método para determinação de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu). Previamente às análises, as cervejas foram degaseificadas por 10 minutos em sistema de ultrasson.

Em todas as análises a diluição das cervejas Pilsen e Malzbier e a curva de calibração diária foram realizadas em solução etanólica 4,5%. Para a cerveja sem álcool, as diluições e a curva de calibração foram realizadas com água Milli-Q. A leitura das análises foi realizada utilizando espectrômetro UV-160 Pro-Análise, Brazil.

2.2.1. Compostos fenólicos totais

O método para determinação de fenólicos totais foi baseado no método apresentado em Singleton (1999), tendo sido realizadas algumas adaptações.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 500 µL da solução de amostra diluída (cerveja Pilsen e sem álcool com diluição 1:5 e cerveja Malzbier 1:10) e 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:10), aguardando-se 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5%, sendo os tubos armazenados por 2 horas ao abrigo de luz.

O branco foi preparado da mesma maneira com solução de etanol 4,5% (Pilsen e Malzbier) ou água Milli-Q (cerveja sem álcool) ao invés das amostras de cerveja. A curva de calibração foi preparada diariamente, com concentração de ácido gálico variando de 1,0 a 8,0 mg/100mL. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 740 nm.

Os resultados foram expressos em EAG (equivalente de ácido gálico) por 100 mL de cerveja.

2.2.2. Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

Para as análises de DPPH utilizou-se um método baseado no método de Brand-Williams et al (1995) com modificação de tempo de espera, já que foi realizado teste de cinética (leitura após 1, 3, 6 e 9 horas de reação) e o teor de DPPH consumido só foi estabilizado após 6 horas (Figura 3).

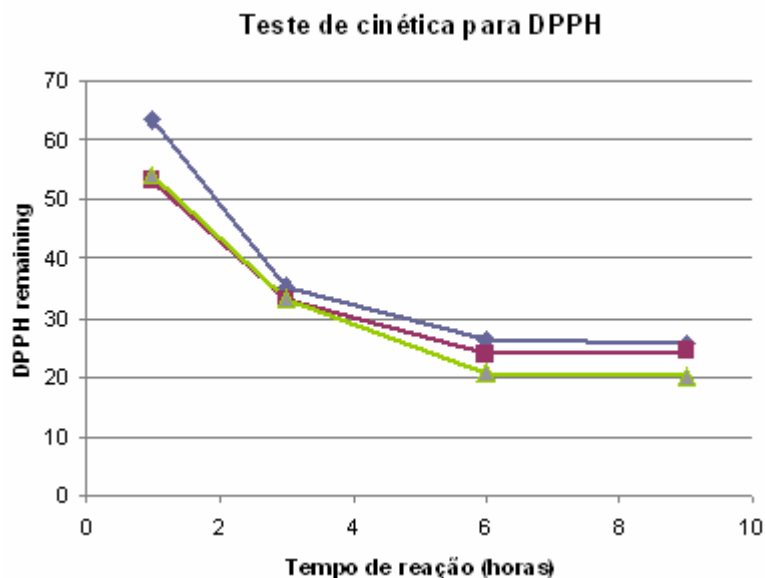


Figura 3: Teste de cinética em triplicata para a cerveja, realizado após 1, 3, 6 e 9 horas de reação com DPPH.

Para as análises adicionou-se 100 μL de cerveja (Pilsen e sem álcool sem diluição e Malzbier diluída 1:2) e 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,11 mol/L), tampou-se os tubos de ensaio e aguardou-se por 6 horas. O branco foi preparado com 100 μL de metanol ao invés das amostras e 3,9 mL de reagente DPPH.

Curvas de calibração de ácido gálico, de ácido ascórbico e de trolox com 7 pontos foram preparadas com concentrações de 11 a 47 $\mu\text{mol}/100\text{mL}$, 45 a 183 $\mu\text{mol}/100\text{mL}$ e 33 a 132 $\mu\text{mol}/100\text{mL}$, respectivamente, sendo aguardadas 6 horas antes das leituras. Desses padrões, foram determinados os índices AAI (antioxidant activity index) e ARP (antiradical power), segundo Scherer e Godoy (2009) e Brand-Willians (1995), respectivamente, com o objetivo de controle de variações entre os dias de análise. Para as amostras, foi calculada a capacidade antioxidante total em micromols equivalentes de ácido gálico (EAG), ácido ascórbico (EAA) e trolox (ET). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 517 nm ajustado com metanol puro.

2.2.3. Potencial antioxidante de redução de ferro (FRAP)

Para esta avaliação utilizou-se um método baseado no método de Benzie e Strain (1996). O FRAP foi preparado com uma parte de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol/L, uma parte de solução de TPTZ 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L e dez partes de tampão acetato 300 mmol/L pH 3,6.

Em cada tudo de ensaio foi adicionado 2,4 mL de reagente FRAP, 240 µL de água destilada e 80 µL de amostra diluída (cerveja Pilsen e sem álcool diluição 1:4 e cerveja Malzbier diluição 1:8). Os tubos foram levados para banho-maria à 37 °C por 15 minutos e ficaram protegidos da luz por mais 4 minutos antes da leitura.

Foram utilizadas curvas de calibração de ácido gálico (5,9 a 29,4 µmol/100mL) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (62 a 500 µmol/100mL) para determinação da capacidade antioxidante total das amostras em micromoles equivalentes de ácido gálico e para determinação do valor de FRAP do padrão de ácido gálico, respectivamente. Também foram realizadas curvas de calibração de trolox (15,5 a 57,1 µmol/100mL) e ácido ascórbico (4,1 a 74,0 µmol/100mL) para efeito de comparação. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 593 nm.

2.3 Análise Estatística

As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados comparados por análise de variância (ANOVA). A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey utilizando-se o programa Statistica (StatSoft, versão 7.0) e considerando significativas as diferenças quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Compostos fenólicos totais

A Tabela 1 apresenta o teor médio dos compostos fenólicos totais em relação aos tipos de cerveja, considerando latas e garrafas um mesmo grupo. Para este teste estatístico foram utilizadas 9 amostras de cada tipo de cerveja, já que a 5ª marca de Malzbier lata não pode ser encontrada no mercado.

Tabela 1: Teor de compostos fenólicos totais (CFT) presentes nas amostras de cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier.

Tipo de Cerveja	Faixa de variação do Teor de CFT* (mg EAG /100mL)	Média de CFT** (mg EAG /100mL)
Pilsen	18,62 – 24,87	21,83 ^b
Sem álcool	11,21 – 25,68	18,67 ^c
Malzbier	39,05 – 55,73	47,05 ^a

* Valores representam a faixa do teor de CFT encontrado para as amostras em relação aos tipos de cerveja (9 marcas de cada tipo), considerando triplicatas de 3 lotes de latas e 3 lotes de garrafas um mesmo grupo.

** Valores são a média do teor de CFT para cada faixa. Para letras iguais não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$). EAG: equivalente em ácido gálico.

Poejo (2009) encontrou em suas amostras de cerveja, de 29,3 a 115,9 mg EAG/100mL, e assim como neste estudo, obteve resultados que indicam as cervejas escuras com maior teor de fenólicos totais, e a cerveja sem álcool com o menor teor.

A cerveja brasileira pode apresentar menor teor de compostos fenólicos pelo fato de, em sua grande maioria, levar na formulação grande quantidade de adjuntos, de modo que a proporção de cevada e lúpulo seja menor no produto final.

A concentração média de fenólicos totais nas amostras analisadas equivale a cerca de um décimo do teor presente em vinho tinto (Poejo, 2009) e um quinto do teor em suco de uva (Frankel et al., 1998); um terço do teor em chá preto e cerca de um quarto do teor presente em chá verde, além de metade do teor em suco de laranja (Bravo et al., 2006).

A cerveja Pilsen brasileira contém quantidade similar a presente em “chimarrão” de erva tradicional no quarto extrato (Meinhart et al., 2010), e ao teor presente em vinho branco (Bravo et al., 2006) e a cerveja Malzbier possui teor similar ao do vinho rosé (Bravo et al., 2006).

Levando-se em conta a embalagem utilizada para armazenagem, foi realizada uma comparação entre o teor de compostos fenólicos totais analisado em cada tipo de cerveja (Tabela 2). Para esta avaliação não foi considerada a marca “J” de cerveja Malzbier garrafa, afim de ser possível a aplicação do teste estatístico.

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG /100mL) em relação ao tipo de embalagem utilizada.

Tipo de Cerveja	Tipo de Embalagem	Faixa de variação do Teor de CFT*	Média de CFT**
Pilsen	Lata	18,62 – 22,69	20,86 ^b
	Garrafa	19,82 – 24,87	22,80 ^a
Pilsen sem álcool	Lata	11,95 – 25,68	18,66 ^a
	Garrafa	11,21 – 24,94	18,67 ^a
Malzbier	Lata	39,05 – 55,73	46,56 ^a
	Garrafa	39,15 – 53,09	46,95 ^a

* Valores representam a faixa do teor de CFT encontrado para as amostras em relação aos tipos de embalagem (5 marcas para Pilsen, 5 marcas para sem álcool e 4 marcas para Malzbier).

** Valores são a média do teor de CFT para cada faixa. Para letras iguais não há diferença significativa nas amostras ($p>0,05$) entre lata e garrafa para cada tipo de cerveja. EAG: equivalente em ácido gálico.

Para a cerveja Pilsen, a cerveja armazenada em lata apresentou menor teor de fenólicos totais que a embalada em garrafa, no entanto tanto para a Malzbier como para a cerveja sem álcool não houve diferença entre as embalagens, não sendo possível afirmar que determinada embalagem seja mais apropriada para evitar a degradação dos compostos fenólicos.

Para a verificação de diferenças entre fabricantes, já que cada um obtém matérias-primas e processos de fabricação diferentes, foi comparado o teor de compostos fenólicos totais em cada marca para a cerveja do tipo Pilsen, sem álcool e Malzbier (Tabela 3).

Tabela 3: Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG /100mL) entre marcas.

Pilsen					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	19,63 – 22,51	20,95 ^a	A	23,57 – 24,24	23,85 ^a
B	19,89 – 22,69	21,56 ^a	B	20,82 – 21,84	21,28 ^b
C	20,18 – 21,62	20,69 ^a	C	22,77 – 23,91	23,38 ^a
D	20,83 – 22,07	21,28 ^a	D	24,62 – 24,87	24,67 ^a
E	18,62 – 20,83	19,82 ^a	E	19,82 – 22,46	20,83 ^b
Pilsen sem álcool					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
G	22,60 – 23,81	23,12 ^a	G	23,87 – 24,94	24,75 ^a
B	21,06 – 25,68	24,14 ^a	B	21,49 – 22,62	22,17 ^b
H	11,95 – 13,44	12,65 ^c	H	11,21 – 12,99	12,24 ^e
I	14,40 – 15,03	14,63 ^c	I	15,96 – 16,25	16,07 ^d
F	18,52 – 18,97	18,77 ^b	F	17,75 – 18,42	18,13 ^c
Malzbier					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**	Marca	Faixa de variação das Concentrações*	Concentração Média**
A	39,05 – 44,26	41,84 ^b	A	39,16 – 44,43	41,25 ^b
B	41,46 – 46,78	43,31 ^b	B	42,12 – 43,88	42,84 ^b
F	46,64 – 48,34	47,21 ^b	F	50,97 – 53,09	51,72 ^a
D	52,73 – 55,73	53,87 ^a	D	51,51 – 52,42	51,99 ^a
J	-	-	J	49,04 – 50,09	49,46 ^a

* Valores representam a faixa de teor de CFT encontrado para as amostras em relação à cada marca de cerveja.

** Valores são a média do teor de CFT para cada faixa. Letras iguais, para cada tipo de cerveja, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa ($p>0,05$). EAG: equivalente em ácido gálico.

Pode-se notar que a maior discrepância entre marcas se dá na cerveja tipo Pilsen sem álcool. Uma hipótese para que este fato ocorra, pode ser porque existem duas vias para produção de cerveja sem álcool, por interrupção da fermentação ou por remoção do álcool no final da produção, e quando se interrompe a fermentação, pode ser que haja impedimento de migração de parte dos polifenóis presentes nas matérias-primas, principalmente do lúpulo, para as cervejas (Poejo, 2009).

Para a cerveja Malzbier, a marca D apresenta teor de compostos fenólico elevado em relação às outras marcas, especialmente em lata. Já para a cerveja Pilsen o teor destes compostos quase não apresenta diferenças.

3.2. Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

Os índices calculados para as curvas de calibração de ácido gálico construídas a cada dia de avaliação, apresentaram em média um IC₅₀ de $1,37 \pm 0,07$ com CV de 4,97%, e um IAA de $30,78 \pm 1,61$ com CV de 5,24%. O EC₅₀ apresentou média de $0,074 \pm 0,003$ enquanto o ARP $13,52 \pm 0,56$ com CVs de 5,24 e 4,11%, respectivamente. Estes índices estão próximos aos obtidos por Scherer e Godoy (2009) e Brand-Williams et al. (1995). Considerando que a metodologia aplicada neste trabalho possui 6 horas de reação, foram encontrados índices ligeiramente diferentes.

Para as curvas de trolox e ácido ascórbico, respectivamente, foram obtidos índices IC₅₀ de 6,47 e 5,21; e IAA de 6,63 e 8,23. O valor encontrado para EC₅₀ e ARP foram, respectivamente, 0,23 e 4,41 para trolox e de 0,27 e 3,76 para ácido ascórbico, estando bastante próximos aos apresentados por Brand-Williams et al. (1995).

A Tabela 4 apresenta a capacidade antioxidante para cada tipo de cerveja, incluindo latas e garrafas em um mesmo grupo. Foram utilizadas 9 amostras de cada tipo de cerveja para este teste estatístico, já que a 5ª marca de Malzbier lata não foi encontrada no mercado.

Tabela 4: Capacidade antioxidante das amostras de cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier pelo ensaio DPPH.

Tipo de Cerveja	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAG/ 100mL}$)	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol ET/ 100mL}$)	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAA/ 100mL}$)
Pilsen	30,78 ^b	102,13 ^b	116,94 ^b
Sem álcool	33,06 ^b	102,56 ^b	177,49 ^b
Malzbier	76,57 ^a	238,68 ^a	275,57 ^a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de cerveja ($p < 0,05$) em cada coluna. Valores correspondem a média entre latas e garrafas avaliadas em triplicata (9 amostras de cada tipo de cerveja). EAG: equivalente em ácido gálico. ET: equivalente em trolox; EAA: equivalente em ácido ascórbico.

A capacidade antioxidante da cerveja Malzbier foi claramente maior que a capacidade antioxidante da cerveja Pilsen e sem álcool pelo ensaio DPPH. Resultado que pode ser correlacionado com o maior teor de compostos fenólicos encontrados (Tabela 1). No entanto, as cervejas Pilsen e a Pilsen sem álcool não apresentaram diferenças significativas entre si.

Freitas et al. (2006) encontraram em suas amostras de cerveja, uma capacidade antioxidante cerca de três vezes maior que a encontrada neste estudo, no entanto os valores entre cervejas escuras e claras foram similares, enquanto que nesta avaliação a cerveja Malzbier mostrou-se com capacidade mais de 100% superior.

Zhao et al. (2010) relatam que através do ensaio DPPH as cervejas analisadas apresentaram de 24 a 135 $\mu\text{mol ET/100mL}$, sendo quase todas chinesas. Embora a grande maioria de suas amostras tenha estado abaixo de 70 $\mu\text{mol ET/100mL}$, os resultados são similares aos encontrados neste trabalho. Picinelli Lobo et al. (2009) encontraram em cidras uma média de 290 $\mu\text{mol EAA/100mL}$ de atividade anti-radical, resultado próximo a cerveja Malzbier.

A Tabela 5 compara a capacidade antioxidante das amostras entre cada embalagem avaliada, excluindo a marca “J” de cerveja Malzbier garrafa.

Tabela 5: Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAG}/100\text{mL}$) das amostras pelo ensaio de DPPH, em relação ao tipo de embalagem utilizada.

Tipo de Cerveja	Tipo de Embalagem	Faixa de variação *	Média **
Pilsen	Lata	23,99 – 35,24	30,12 ^a
	Garrafa	26,21 – 35,47	31,81 ^a
Pilsen sem álcool	Lata	19,73 – 51,96	30,46 ^a
	Garrafa	17,27 – 57,28	37,66 ^a
Malzbier	Lata	63,82 – 92,92	77,01 ^a
	Garrafa	56,96 – 88,93	74,23 ^a

* Valores representam a faixa da capacidade antioxidante encontrada para as amostras em relação aos tipos de embalagem (5 marcas para Pilsen, 5 marcas para sem álcool e 4 marcas para Malzbier).

** Valores são a média da capacidade antioxidante para cada faixa. Para letras iguais não há diferença significativa nas amostras ($p>0,05$) entre lata e garrafa para cada tipo de cerveja. EAG: equivalente em ácido gálico

Novamente, as duas embalagens utilizadas não influenciaram na capacidade antioxidante dos diferentes tipos de cerveja. Nem mesmo na cerveja tipo Pilsen, a qual apresentou diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais em cerveja embalada em lata e em garrafa (Tabela 2).

A Tabela 6 mostra a capacidade antioxidante em cada marca para as cervejas analisadas.

Tabela 6: Diferenças de capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAG}/100\text{mL}$) das amostras entre marcas pelo ensaio de DPPH.

Pilsen					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
A	28,73 – 31,41	29,95 ^a	A	31,60 – 32,29	32,05 ^{ab}
B	23,99 – 30,46	28,09 ^a	B	30,13 – 32,51	31,01 ^b
C	28,69 – 35,24	32,56 ^a	C	30,84 – 32,90	31,85 ^{ab}
D	28,26 – 33,22	30,72 ^a	D	34,90 – 35,47	35,18 ^a
E	27,16 – 31,56	29,29 ^a	E	26,21 – 31,16	28,94 ^b
Pilsen sem álcool					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
G	32,49 – 35,55	33,72 ^{ab}	G	52,44 – 56,81	54,96 ^a
B	38,61 – 51,96	43,07 ^a	B	35,02 – 57,28	44,56 ^a
H	19,73 – 33,79	24,42 ^b	H	17,27 – 20,02	18,97 ^b
I	21,35 – 21,93	21,68 ^b	I	42,47 – 44,09	43,52 ^a
F	27,28 – 32,91	29,45 ^{ab}	F	25,42 – 26,82	26,29 ^b
Malzbier					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
A	68,42 – 71,27	69,56 ^b	A	56,95 – 67,43	61,12 ^b
B	63,82 – 65,66	64,89 ^b	B	65,73 – 67,19	66,45 ^b
F	78,69 – 84,75	81,39 ^a	F	79,27 – 88,93	82,59 ^a
D	91,26 – 92,92	92,19 ^a	D	86,11 – 87,22	86,74 ^a
J	-	-	J	83,85 – 84,77	84,20 ^a

* Valores representam a faixa de capacidade antioxidante encontrada para as amostras em relação à cada marca de cerveja.

** Valores são a média da capacidade antioxidante para cada faixa. Letras iguais, para cada tipo de cerveja, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa ($p>0,05$). EAG: equivalente em ácido gálico.

Os diferentes processos de fabricação e matérias-primas utilizadas resultaram em diferentes capacidades de captura do radical DPPH. A cerveja sem álcool apresentou para algumas marcas, valores mais de 100% superiores a outras. As marcas F, D e J de cerveja Malzbier apresentaram a maior capacidade antioxidante encontrada, superior a 80,0 $\mu\text{mol EAG/ 100mL}$.

Embora de uma maneira geral a embalagem não tenha influenciado na capacidade antioxidante das amostras (Tabela 5), a cerveja sem álcool marcas G e I apresentaram uma grande discrepância, na qual a lata apresenta diferença de quase 40 e 50% em relação à garrafa, respectivamente, na capacidade antioxidante medida pelo ensaio DPPH.

3.3. Potencial antioxidante de redução de ferro (FRAP)

O valor de FRAP obtido através da curva de Fe_2SO_4 foi de 2,3 em média para o Trolox, valor similar ao apresentado por Brand-Williams (1995). Para o ácido gálico e ácido ascórbico foram, 7,2 e 4,3 respectivamente.

A Tabela 7 apresenta o potencial antioxidante de redução do ferro para as cervejas tipo Pilsen, sem álcool e Malzbier incluindo as duas embalagens analisadas. Na análise estatística foram avaliadas 9 amostras de cada tipo de cerveja (não foi encontrada no mercado a 5ª marca de Malzbier lata).

Tabela 7: Capacidade antioxidante das amostras das cervejas pelo ensaio FRAP.

Tipo de Cerveja	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAG/ 100mL}$)	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol ET/ 100mL}$)	Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol AA/ 100mL}$)
Pilsen	46,51 ^b	136,49 ^b	102,05 ^b
Sem álcool	34,47 ^c	99,60 ^c	72,46 ^c
Malzbier	115,79 ^a	314,36 ^a	245,50 ^a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de cerveja ($p > 0,05$) em cada coluna. Valores correspondem a média entre latas e garrafas avaliadas em triplicata (9 amostras de cada tipo de cerveja). EAG: equivalente em ácido gálico. ET: equivalente em trolox; EAA: equivalente em ácido ascórbico.

A capacidade de redução do ferro encontrada para as cervejas Pilsen é similar a de suco de maçã despectinizado e fermentado de maçã Fuji, 190,9 e 185,3 $\mu\text{mol ET/ 100mL}$ respectivamente. E a capacidade antioxidante da cerveja Malzbier é próxima ao

suco de maçã despectinizado 437,6 $\mu\text{mol ET/ 100mL}$ e fermentado de maçã Gala, 359,4 $\mu\text{mol ET/ 100mL}$ (Zardo et al., 2009).

A Tabela 8 apresenta a capacidade antioxidante pelo ensaio FRAP em cada tipo de cerveja, levando-se em conta a embalagem utilizada para armazenagem. Para aplicação do teste estatístico não foi considerada a marca “J” de cerveja Malzbier garrafa.

Tabela 8: Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol EAG/ 100mL}$) pelo ensaio FRAP em relação ao tipo de embalagem utilizada.

Tipo de Cerveja	Tipo de Embalagem	Faixa de variação *	Média **
Pilsen	Lata	36,47 – 51,03	43,57 ^b
	Garrafa	40,93 – 55,55	48,03 ^a
Pilsen sem álcool	Lata	21,46 – 52,47	37,60 ^a
	Garrafa	21,32 – 44,69	34,00 ^a
Malzbier	Lata	96,29 – 153,97	117,76 ^a
	Garrafa	82,82 – 147,53	109,14 ^a

* Valores representam a faixa da capacidade antioxidante encontrada para as amostras em relação aos tipos de embalagem (5 marcas para Pilsen, 5 marcas para sem álcool e 4 marcas para Malzbier).

** Valores são a média da capacidade antioxidante para cada faixa. Para letras iguais não há diferença significativa nas amostras ($p>0,05$) entre lata e garrafa para cada tipo de cerveja. EAG: equivalente em ácido gálico

Assim como o teor de fenólicos totais (Tabela 1) a cerveja Pilsen apresenta a garrafa como embalagem mais apropriada para potencial de redução do ferro (Tabela 8).

A comparação da capacidade antioxidante das amostras analisadas entre as diferentes marcas está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9: Potencial de redução do ferro ($\mu\text{mol EAG}/100\text{mL}$) entre as marcas avaliadas.

Pilsen					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
A	36,47 – 44,62	41,84 ^{ab}	A	47,68 – 50,99	49,64 ^a
B	42,13 – 47,75	45,19 ^{ab}	B	42,36 – 44,82	43,56 ^b
C	36,52 – 43,61	39,37 ^b	C	49,50 – 55,20	51,48 ^a
D	47,25 – 51,03	48,91 ^a	D	49,94 – 55,55	52,43 ^a
E	40,28 – 45,34	42,56 ^{ab}	E	40,93 – 46,77	43,00 ^b
Pilsen sem álcool					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
G	43,83 – 50,56	46,61 ^a	G	41,78 – 44,69	43,05 ^a
B	38,97 – 52,48	47,75 ^a	B	42,31 – 42,54	42,37 ^a
H	21,46 – 24,84	23,68 ^b	H	21,32 – 24,15	23,04 ^d
I	27,92 – 28,65	28,23 ^b	I	25,39 – 26,33	25,84 ^c
F	40,31 – 42,87	41,74 ^a	F	34,81 – 38,56	35,69 ^b
Malzbier					
Lata			Garrafa		
Marca	Faixa de variação *	Média**	Marca	Faixa de variação *	Média**
A	97,39 – 110,92	103,13 ^b	A	82,82 – 87,47	85,71 ^b
B	96,29 – 107,00	101,86 ^b	B	85,02 – 103,43	96,78 ^b
F	106,97 – 122,96	117,50 ^b	F	117,56 – 127,44	123,01 ^a
D	140,41 – 153,97	148,55 ^a	D	122,21 – 147,53	131,04 ^a
J	-	-	J	133,41 – 136,82	134,57 ^a

* Valores representam a faixa de capacidade antioxidante encontrada para as amostras em relação à cada marca de cerveja.

** Valores são a média da capacidade antioxidante para cada faixa. Letras iguais, para cada tipo de cerveja, na mesma coluna (lata e garrafa) não apresenta diferença significativa ($p>0,05$). EAG: equivalente em ácido gálico.

A Cerveja sem álcool apresentou os valores mais discrepantes entre as amostras e a Malzbier novamente aparece como o tipo de cerveja com maior capacidade antioxidante. A marca “B” que fabrica os três tipos de cerveja analisadas, apresenta capacidade antioxidante na Malzbier de mais de 100% superior a cerveja Pilsen e sem álcool.

4. Conclusões

A concentração de compostos fenólicos nas cervejas brasileiras analisadas é equivalente ao vinho branco (cerveja Pilsen e sem álcool) e ao vinho rosé (cerveja Malzbier). A cerveja Malzbier apresentou a maior capacidade antioxidante através de ambos os métodos aplicados, corroborando com o maior teor de fenólicos totais presentes, e a cerveja sem álcool é a que mais apresentou diferenças de teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante entre as marcas analisadas de um mesmo tipo de cerveja.

Houve relação direta entre o teor de fenólicos totais e os ensaios realizados, o que indica uma forte influência destes compostos sobre a atividade antioxidante das cervejas, no entanto a comparação do tipo de embalagem utilizada resultou em relevância somente para a cerveja Pilsen, no teor de fenólicos totais e capacidade de redução do ferro, não possuindo influência nas cervejas sem álcool e Malzbier.

Se consumida com moderação, a cerveja pode ser um alimento auxiliar como fonte de compostos fenólicos, possuindo boa capacidade antioxidante.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

6. Referências Bibliográficas

- 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.
- BIRCH, A. E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4502-4507, 2001.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolic constituents. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405. 2007.
- BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4841-4844, 2001.
- CAMPOS F. M., MARTINO H. S. D., SABARENSE C. M., PINHEIRO-SANTANA H. M.; Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v.19, n.4, p. 481-490, 2008.
- CLIFFORD M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372. 1999.
- CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemey extract. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 9, p. 1141-1145, 1998.
- EWALD, C.; MODIG, S. E.; JOHAANSSON, K.; SJOHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, n. 64, p. 231-235, 1999.

FANTOZZI, P., MONTANARI, L., MANCINI, F., GASBARRINI, A., ADDOLORATO, G., SIMONCINI, M., NARDINI, M., GHISELLI, A., SCACCINI, C. In vitro antioxidant capacity from wort to beer. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 31, p. 221-227, 1998.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FREITAS, G. L., KUSKOSKI E. M., GONZAGA L., FETT R., Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.3, p.303-307, 2006.

GASBARRINI, A., ADDOLORATO, G., SIMONCINI, M., GASBARRINI, G., FANTOZZI, P., MANCINI, F., MONTANARI, L., NARDINI, M., GHISELLI, A. SCACCINI, C. Beer affects oxidative stress due to ethanol in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, p. 1332-1338, 1998.

GONZALEZ SAN JOSÉ, M. L.; MUNIZ RODRIGUEZ, P.; VALL BELLÉS, Y. V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo (1ª parte). **Cerveza y Salud**, v. 154, p. 47-54, 2001.

GORINSTEIN, S., CASPI, A., ZEMSER, M., TRAKHTENBERG, S. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutrition Research**, v. 20, p. 131-139. 2000.

GROMUS, J., LUSTIG, S. Influence of polyphenols and reducing substances on beer quality and their fate during beer production. Bulletin of the European Brewery Convention, Brewing Science Group, p. 192-217, 1998.

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

HERMANN K., Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 315–347. 1989.

HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E., STEVENS, J. S., YOUNG, T. W. Chemical and physical properties of beer. In: HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E., STEVENS, J. S. YOUNG, T. W. (Eds) **Malting and Brewing Science**. London: Chapman & Hall, 1981. p. 821-828

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.

LU, J., ZHAO, H., CHEN, J., FAN, W., DONG, J., KONG, W. SUN J., CAO Y., CAI G. , . Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10994–11001. 2007.

MARTÍNEZ-FLORES S., GONZÁLEZ-GALLEGO J., CULEBRAS J. M. E TUÑÓN M. J., Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, **Nutrición Hospitalaria**, v.17, p.271–278. 2002.

MEINHART A. D. , BIZZOTTO C. S., BALLUS C. A. , RYBKA A. C. P., SOBRINHO M. R.,ROMINA SOFIA CERRO-QUINTANA R. S.,TEIXEIRA-FILHO J., GODOY H. T. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (Ilex paraguariensis St. Hil) Beverages **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, DOI:10.1021/jf903781w. ASAP. 2010.

MIDDLETON E. J., KANDASWAMI C., Effects of flavonoides on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 1167–1179. 1992.

MOLL, M. Colloidal stability of beer. In: POLLOCK, J. R. A. (Ed.) **Brewing Science**, v. 3 New York: Academic Press, 1987. p. 46-47.

MONTANARI, L., PERRETTI, G., NATELLA, F., GUIDI, A., FANTOZZI, P. Organic and phenolic acids in beer. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 32, p. 535–539. 1999.

NARDINI M., NATELLA F., SCACCINI C., GHISELLI A., Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 14-22, 2006.

PATHAK D., PATHAK K., SINGLA A. K. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. **Fitoterápica**, v. 62, p. 371-389, 1991.

PICINELLI LOBO A., GARCIA Y. D., SANCHEZ J. M., MADRERA R. R., VALLES B. S. Phenolic and antioxidant composition of cider. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 644–648. 2009.

POEJO, P. L. P., Antioxidantes em diferentes tipos de bebidas: vinho e cerveja. 2009 106p. Dissertação (Mestre em Tecnologia Alimentar/Qualidade) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2009.

RUFINO M. S. M., ALVES R. E., BRITO E. S., MORAIS S. M., SAMPAIO C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ J., SAURA-CALIXTO F. D., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP) **Comunicado técnico online**, ISSN 1679-6535, Fortaleza, 2006.

RUFINO M. S. M., ALVES R. E., BRITO E. S., MORAIS S. M., SAMPAIO C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ J., SAURA-CALIXTO F. D., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico online**, ISSN 1679-6536, Fortaleza, 2007.

SANTOS, M.H. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v.30, n.3, p.604-610, 2007.

SCALBERT A., WILLIAMSON G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols, **Journal of Nutrition**, v.130 , p. 2073–2085. 2000.

SCHERER, R.; GODOY H., Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, **Food Chemistry**, v. 112, p. 654–658, 2009.

SIQUEIRA, P.B.; BOLINI, H.M.A.; MACEDO, G.A. Beer production and its effects on the presence of polyphenols. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 491-498, 2008.

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. In: Methods in Enzymology v .299: Oxidants and Antioxidants Part A (L. Packer, ed.), p. 152-178, **Academic Press**, New York, 1999.

SOUSA, C., SILVA H., VIEIRA-JR G., AYRES M., COSTA L., ARAÚJO D., CAVALCANTE L., BARROS E., ARAÚJO P., BRANDÃO M., CHAVES M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

VANDERHAEGEN, B., NEVEN, H., VERACHTERT, H., DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – A critical review. **Food Chemistry** , v. 95, p. 357–381. 2006.

WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4977-4982, 2001.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p.113-122, 2004.

YILDRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4083-4089, 2001.

ZARDO D. M.; ALBERTI A.; DANTAS A. P. C.; GUYOT S.; WOSIACKI G.; NOGUEIRA A., Effect of the processing in the phenolic compounds content and antioxidant activity in apple wine. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-370, 2009.

ZHAO, H., FAN, W., DONG, J., LU, J., CHEN, J., SHAN, L., LIN Y, KONG W., Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. **Food Chemistry**, v. 107, p. 296-304. 2008.

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

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.

Capítulo 5

Teor de trans-2-nonenal em cervejas brasileiras

Ana Cecília P. Rybka¹, Marcos D. R. Gomes da Silva² e Helena T. Godoy^{1*}

¹ Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil. ² Departamento de Química, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (UNL).

* helena@fea.unicamp.br

RESUMO

Compostos carbonílicos, particularmente aldeídos, têm papel importante na deterioração do aroma e sabor da cerveja durante a estocagem e o trans-2-nonenal parece ser uma das principais causas do sabor envelhecido. Muitos métodos analíticos para determinação de aldeídos em cerveja têm sido desenvolvidos. Neste trabalho foi utilizado o método de *headspace* com microextração em fase sólida e identificação e quantificação em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (HS-SPME-GCMS). Foram analisadas cinco marcas da cerveja tipo Pilsen, cinco marcas da Pilsen sem álcool e quatro marcas de cerveja tipo Malzbier em lata. As condições cromatográficas foram: início em temperatura de 60°C e fim em 200°C. Utilizou-se coluna 5%-fenil-metilpolisiloxano (HP-5MS). O gás de arraste (hélio) teve vazão constante de 1,0 mL/min. Os íons monitorados para a quantificação (m/z) foram 55, 70 e 83 (fonte de ionização de 70eV). O teor de trans-2-nonenal encontrado variou de 0,11 a 0,46 µg/L, estando acima de seu threshold (0,1 µg/L). A partir da aplicação do teste estatístico t student foi encontrada diferença significativa entre amostras de um mesmo tipo de cerveja, porém não houve diferença significativa entre os três tipos de cerveja analisados.

Palavras-chave: (*E*)-2-nonenal, cerveja, SPME, GC-MS

ABSTRACT

Carbonyl compounds, aldehydes particularly, are important for aroma and taste deterioration during beer storage, and E-2-nonenal seems to be the major cause of the aged flavor. Many analytical methods for aldehydes determination in beer have been developed. In this work, was used a headspace solid phase micro extraction method for compound isolation and identification and quantification were made by gas chromatography coupled to mass spectrometer (HS-SPME-GC-MS). Five brands of beer Pilsen type, five brands of alcohol-free Pilsen and four brands of Malzbier beer type in cans were examined. The chromatographic conditions were: start at temperature of 60 °C, and had an end at 200 °C. It was used column 5%-phenyl-methylpolysiloxane (HP-5MS). The carrier gas (helium) flow rate was constant at 1.0 mL / min. Monitored ions for quantification (m/z) were 55, 70 and 83 (source of ionization of 70eV). The E-2-nonenal levels ranged from 0.11 to 0.46 µg / L, above its threshold (0,1 µg/L). Applying the Student t statistical test, significant difference was found between samples of the same type of beer, but not significant difference between the three types of analyzed beer.

Keywords: (*E*)-2-nonenal, beer, HS-SPME, GCMS

1. Introdução

A estabilidade do sabor é um fator de qualidade importante para a cerveja. O conhecimento neste campo foi resumido por diversos autores (Brown, 1989; Dalglish, 1977; Devreux, Blockmans e Van de Meersche, 1981; Drost et al., 1974; Narziss, 1986, Saison et al., 2009). No atual momento de mercado globalizado, o crescimento verificado na exportação da cerveja, tem aumentado a demanda por pesquisas sobre os fatores que afetam seu aroma e gosto, afim de prolongar a vida de prateleira (Guyot-Declerck et al., 2005; Pinho et al., 2006; Vanderhaegen, 2006; Guido et al., 2005).

Neste contexto, estudos têm sido realizados com o intuito de discutir a conservação da cerveja, sabendo-se que está diretamente relacionada à temperatura de estocagem (Wackerbauer e Hardt, 1997; Madigan e Perez, 1998 e Wang e Siebert, 1974), ao pH (Kaneda et al., 1997) e aos níveis de oxigênio a que é exposta (Drost et al., 1990 e Bamforth, 2000).

Do ponto de vista analítico o trans-2-nonenal é um dos compostos mais citados ao se relacionar aumento de concentração de composto com oxidação de cerveja (Meilgaard, 1975; Liegeois et al., 2002; Santos et al., 2003, Saison et al., 2009). Seu *threshold* é bastante baixo, cerca de 0,1 µg/L na cerveja fresca (Meilgaard, 1975), e apesar de ser característico em cervejas envelhecidas, muitas vezes o sabor oxidado é encontrado em cervejas com cerca de 3 meses de vida de prateleira (Santos et al., 2003).

Muitas pesquisas têm sido realizadas para tentar identificar a origem dos compostos responsáveis pelo sabor envelhecido na cerveja. Acredita-se que as oxidações enzimáticas e não enzimáticas dos lipídios sejam os principais mecanismos responsáveis pela geração do trans-2-nonenal (Drost et al., 1990). Assim sendo, o pH da cerveja durante seu envelhecimento também aparenta ter forte influência sobre a formação deste composto (Guyot-Declerck et al., 2005).

Diversos métodos analíticos para determinação de aldeídos em cerveja têm sido desenvolvidos, e bons resultados foram obtidos utilizando extração líquido-líquido (Tressl et al., 1978) e destilação (Barret, Hasley e Peppard, 1983), no entanto estes métodos são complicados e não muito seletivos (Vesely et al., 2003).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparo de amostra desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores em 1990 (Arthur e Pawliszyn, 1990; Zhang et al., 1994) que utiliza uma fibra de sílica fundida recoberta por uma fase estacionária

apropriada. O analito entra em equilíbrio com a fibra de acordo com sua afinidade pela fase sólida. Em contraste com as técnicas convencionais de preparo de amostra, a SPME é um método que não utiliza solventes e permite que as etapas de extração e concentração sejam feitas num único procedimento (Beltran et al., 2000), podendo ser facilmente acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência e à cromatografia a gás (Yang et al., 1999). A cromatografia a gás apresenta diversas vantagens, como rapidez, alta eficiência, alta sensibilidade, alta precisão, necessidade de pouca quantidade de amostra e simplicidade em relação ao CLAE (McNair e Miller, 1997).

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi quantificar o trans-2-nonenal em cervejas brasileiras, nos tipos mais consumidos no país, Pilsen e Malzbier, assim como na Pilsen sem álcool, utilizando HS-SPME como técnica de extração, e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas como técnica de análise.

2. Material e Métodos

2.1. Material

As amostras de cerveja foram adquiridas nos supermercados da região de Campinas com datas de validade próximas ao seu vencimento, sendo compostas por três lotes de cada amostra em lata de 350 mL. Foram analisadas 5 marcas da cerveja tipo Pilsen (fabricante A, B, C, D e E), 5 marcas da Pilsen sem álcool (fabricante B, F, G, H e I) e 4 marcas de cerveja tipo Malzbier (A, B, D e F).

Os materiais utilizados no experimento foram adquiridos das empresas Varian (fibra utilizada para extração HS-SPME), Sigma-Aldrich (padrão do composto trans-2-nonenal 97% de pureza), Vetec (etanol grau HPLC), e Merck (ácido fosfórico). A água foi purificada através do sistema MilliQ (Millipore).

2.2. Preparo da amostra e análise

A determinação do trans-2-nonenal foi realizada baseando-se no método desenvolvido por Scherer et al. (2009). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As amostras foram colocadas no ultrasson por 30 segundos antes da extração, para remoção parcial do gás carbônico, e então o analito foi extraído das amostras de cerveja em fibra mista (Carboxen/PDMS- 75µm) pelo método de headspace com

microextração em fase sólida (HS-SPME) e injeção através de dispositivo (holder) manual.

A extração foi realizada em frasco de 23 mL com 10 mL de amostra, extraídos a 50°C utilizando agitação com barra magnética, com tempo de equilíbrio de 15 minutos e tempo de extração de 90 minutos. O tempo de dessorção da fibra no injetor foi 10 minutos e o período de *splitless* de 2 minutos.

A identificação e quantificação foram realizadas por GCMS em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu 17A) acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu QP 5000). Foi utilizada a coluna 5%-fenil-metilpolisiloxano (HP-5MS) de 30 metros, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (J&W Scientific).

No cromatógrafo a gás a temperatura do injetor foi de 280°C e na interface GC/MS 240°C. A fonte de ionização foi configurada em 70eV. A corrida se iniciou com 60°C e rampa de aquecimento de 3 °C/min até atingir 100°C, em seguida rampa de 10 °C/min até atingir 200°C e então permanência a 200°C por 7 minutos para limpeza da coluna.

O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL/min. Os íons monitorados para a quantificação (m/z) foram 55, 70 e 83.

2.3. Validação do Método

A quantificação do trans-2-nonenal foi realizada através de calibração externa, com padrão diluído em solução de água com 5% de etanol, e pH ajustado para 4,5 com ácido fosfórico, nas concentrações 1,27; 0,59; 0,25; 0,11; 0,05 e 0,08 µg/L. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

O limite de detecção foi estimado por diluições sucessivas do padrão de concentrações conhecidas, até a determinação da menor quantidade detectável como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento ($S/R \geq 3$) (Ribani et al., 2004). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção.

Para a avaliação da exatidão do método (Rodriguez et al., 1995; Ribani et al., 2004), foram realizados testes de recuperação do padrão adicionado. Para essa determinação, analisou-se inicialmente, o teor de trans-2-nonenal naturalmente presente em uma matriz de cerveja, através da média de 10 análises. Posteriormente, adicionou-se

0,05 µg/L no nível 1 e 0,59 µg/L no nível 2, calculando-se a recuperação de acordo com Rodriguez et al. (1995), através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração amostra})}{\text{Concentração adicionada}} \times 100\%$$

A precisão foi avaliada através da precisão intermediária e da repetibilidade do método. A repetibilidade foi realizada através de dez determinações consecutivas, nos níveis de concentração de trans-2-nonenal encontrados nas matrizes e em dois níveis de concentração de trans-2-nonenal adicionados, e calculada de acordo com Ribani et al. (2004). A precisão intermediária foi realizada através de três determinações consecutivas, nos mesmos níveis adicionados, realizadas em três diferentes dias (Ribani et al., 2004).

2.4. Análise Estatística

Realizou-se teste estatístico Anova e Tukey, utilizando-se o programa Estatística (versão 7.0), e considerando significativas as diferenças quando $p \leq 0,05$ (ANOVA/teste de Tukey).

3. Resultados e Discussão

3.1 Validação do Método

Para identificação do trans-2-nonenal foi utilizado o detector de massas no modo de varredura (*full scan*), sendo identificado no tempo de retenção de 13,1 minutos. O espectro de massas obtido encontra-se na Figura 1.

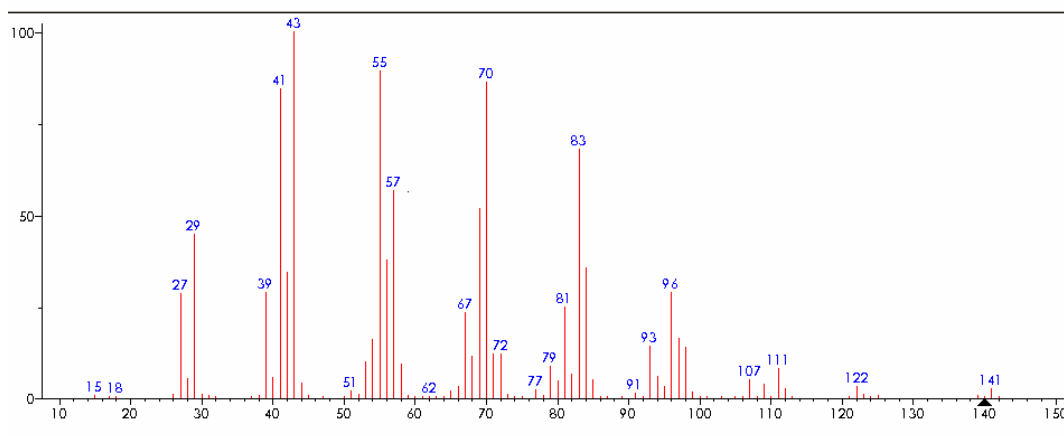


Figura 1: Espectro de massas do trans-2-nonenal (software Class 5000).

Foram então selecionados para quantificação do trans-2-nonenal os íons (m/z) 55, 70 e 83 através do modo SIM (*selected ion monitoring*), sendo obtido para o padrão de trans-2-nonenal o cromatograma indicado na Figura 2.

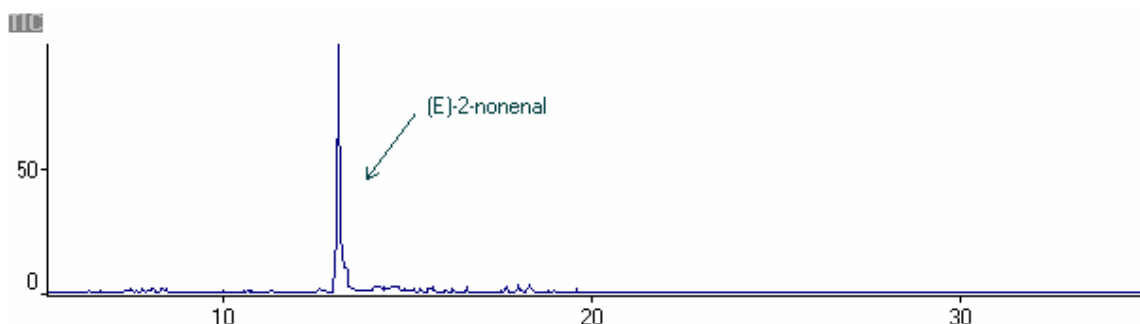


Figura 2: Cromatograma obtido da solução padrão de trans-2-nonenal, no modo SIM, massas 55, 70 e 83.

Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as concentrações de 0,08 a 1,27 $\mu\text{g/L}$ de trans-2-nonenal, obtendo-se $R^2 = 0,9993$, indicando ótima linearidade.

Outros autores, utilizando diferentes métodos de extração, obtiveram o mesmo valor, como Ochiai et al. (2003), ou semelhantes, como Vesely et al. (2003), que encontraram $R^2 = 0,9944$. Scherer et al. (2009) obtiveram uma linearidade de $R^2 = 0,9994$, valor similar ao encontrado neste trabalho.

O limite de detecção encontrado foi de 0,008 $\mu\text{g/L}$ e o limite de quantificação 0,017 $\mu\text{g/L}$. A recuperação obtida para o nível 1 foi de 92,5% e para o nível 2 de 106,6%. Os

valores de recuperação também estão próximos ao obtido por Scherer et al. (2008), 96,5%, e acima do encontrado por Vesely et al. (2003), 89%.

A repetibilidade foi realizada através de dez determinações consecutivas, nos níveis de concentração de trans-2-nonenal encontrados nas matrizes e com adição em dois níveis de concentração, conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1: Repetibilidade de trans-2-nonenal em cerveja.

Concentração de T2N naturalmente presente (µg/L)	CV%	Concentração de T2N com adição de 0,05 µg/L	CV%	Concentração de T2N com adição de 0,59 µg/L	CV%
0,24	2,65	0,27	3,28	0,89	2,90
0,24		0,28		0,85	
0,24		0,29		0,87	
0,25		0,28		0,86	
0,24		0,29		0,86	
0,25		0,29		0,86	
0,24		0,29		0,83	
0,23		0,30		0,87	
0,25		0,30		0,89	
0,25		0,29		0,92	
0,24 ± 0,01 *		0,29 ± 0,01 *		0,87 ± 0,03 *	

* Média dos valores ± estimativa do desvio padrão

Os valores obtidos para a precisão intermediária estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2: Concentrações de trans-2-nonenal em cerveja em três diferentes dias para avaliação da precisão intermediária.

Níveis Adicionados	Concentrações Dia 1	Concentrações Dia 2	Concentrações Dia 3	CV% (3 dias)
Naturalmente presentes	0,24	0,24	0,24	2,38
	0,24	0,25	0,25	
	0,24	0,23	0,26	
	0,24 ± 0,00; 0,70%*	0,24 ± 0,01; 4,13%*	0,25 ± 0,01; 3,34%*	
Adição Nível 1 (0,05 µg/L)	0,27	0,31	0,31	4,24
	0,28	0,29	0,29	
	0,29	0,32	0,28	
	0,28 ± 0,01; 3,00%*	0,31 ± 0,02; 5,02%*	0,29 ± 0,02; 5,33%*	
Adição Nível 2 (0,59 µg/L)	0,89	0,88	0,81	2,22
	0,85	0,91	0,85	
	0,87	0,90	0,92	
	0,87 ± 0,02; 2,21%*	0,90 ± 0,01; 1,11%*	0,86 ± 0,06; 6,63%*	

* Média dos valores ± estimativa do desvio padrão;%CV

A repetibilidade do método mostrou-se excelente, estando com menor variação entre as análises do que a conseguida por Vesely et al. (2003), que obteve 8%; Scherer et al. (2009) que encontraram 4% e Pinho et al. (2006) que em sua avaliação para aldeídos, obtiveram 6,7%.

3.2 Resultados das Amostras

A Figura 3 apresenta o detalhamento dos cromatogramas obtidos para a cerveja Pilsen, sem álcool e Malzbier.

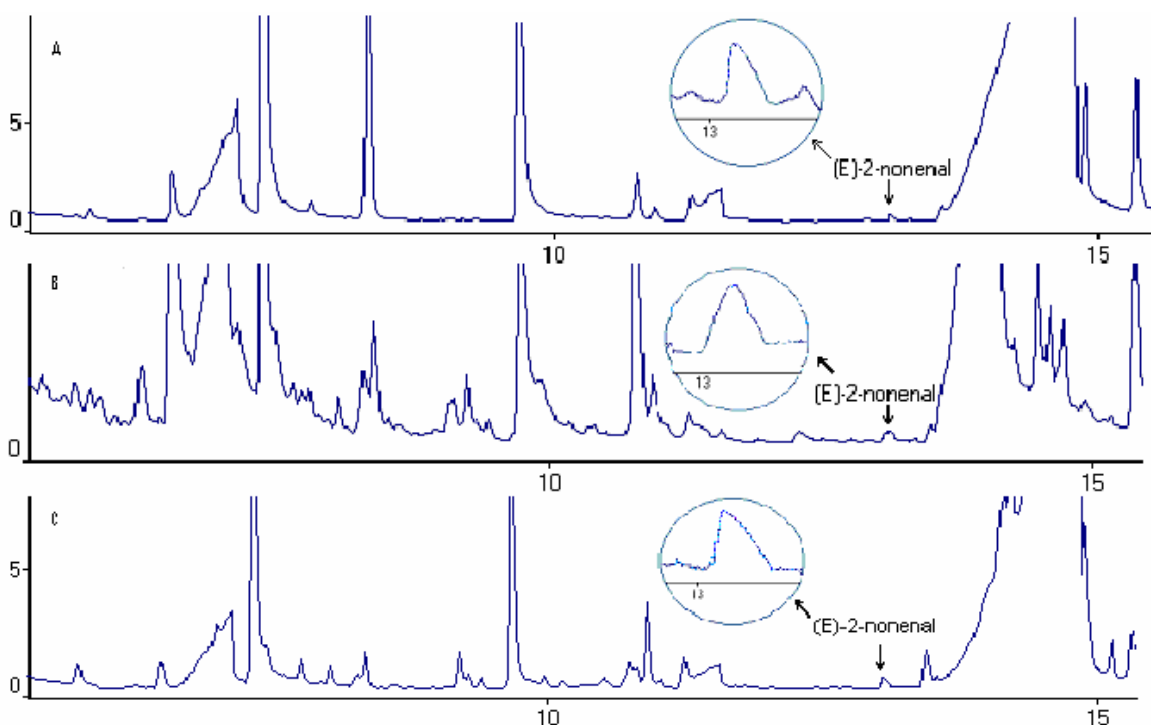


Figura 3: Detalhamento dos cromatogramas obtidos em amostra de cerveja tipo Pilsen (A), sem álcool (B) e Malzbier (C), no modo SIM, os íons monitorados para a quantificação (m/z) foram 55, 70 e 83.

O teor de trans-2-nonenal obtido nas cervejas tipo Pilsen, Malzbier e Pilsen sem álcool estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3: Teor de trans-2-nonenal na cerveja Pilsen.

Marca	Lote	Concentração (µg/L)	desvio padrão	CV%
A	1	0,24	0,01	2,03
	2	0,21	0,01	5,97
	3	0,23	0,01	2,48
	Média	0,23^a	0,01	6,23
B	1	0,22	0,01	6,61
	2	0,22	0,02	6,97
	3	0,18	0,01	2,71
	Média	0,21^{ab}	0,02	10,53
C	1	0,24	0,01	6,04
	2	0,37	0,02	4,12
	3	0,24	0,01	3,90
	Média	0,28^c	0,07	26,26
D	1	0,12	0,01	7,65
	2	0,22	0,01	4,34
	3	0,16	0,01	5,96
	Média	0,16^b	0,05	30,45
E	1	0,21	0,01	4,96
	2	0,27	0,02	7,59
	3	0,25	0,01	4,03
	Média	0,25^{ac}	0,03	12,98

CV%: % coeficiente de variação.

Letras iguais: não há diferença significativa entre as marcas ($p>0,05$).

Tabela 4: Teor de trans-2-nonenal na cerveja Malzbier.

Marca	Lote	Concentração (µg/L)	desvio padrão	CV%
A	1	0,20	0,01	5,17
	2	0,24	0,02	6,97
	3	0,28	0,01	4,05
	Média	0,24^a	0,03	13,86
B	1	0,14	0,00	2,91
	2	0,11	0,00	1,63
	3	0,16	0,02	9,76
	Média	0,14^b	0,03	17,69
D	1	0,35	0,01	1,76
	2	0,19	0,00	1,87
	3	0,25	0,02	6,58
	Média	0,26^a	0,08	31,23
F	1	0,27	0,00	1,12
	2	0,24	0,00	1,83
	3	0,20	0,01	5,99
	Média	0,24^a	0,04	16,21

CV%: % coeficiente de variação.

Letras iguais: não há diferença significativa entre as marcas ($p>0,05$).

Tabela 5: Teor de trans-2-nonenal na cerveja Pilsen sem álcool.

Marca	Lote	Concentração (µg/L)	desvio padrão	CV%
B	1	0,24	0,01	2,57
	2	0,26	0,01	4,15
	3	0,24	0,00	1,81
	Média	0,25^a	0,01	4,84
F	1	0,12	0,01	7,33
	2	0,14	0,01	7,21
	3	0,12	0,01	3,69
	Média	0,13^b	0,01	5,90
G	1	0,31	0,02	7,87
	2	0,24	0,01	2,97
	3	0,19	0,01	5,29
	Média	0,29^a	0,06	22,61
H	1	0,15	0,01	3,61
	2	0,19	0,02	10,39
	3	0,15	0,02	10,44
	Média	0,17^{ab}	0,02	14,05
I	1	0,46	0,01	2,95
	2	0,12	0,00	3,73
	3	0,15	0,00	0,47
	Média	0,24^a	0,19	78,12

CV%: % coeficiente de variação.

Letras iguais: não há diferença significativa entre as marcas ($p > 0,05$).

Os resultados demonstram que nas cervejas brasileiras analisadas o teor de trans-2-nonenal está acima do *threshold* indicado por Saison et al. (2009) (0,03 µg/L); Palamand e Hardwick (1969) e Van Eerde e Strating (1981) (0,05 µg/L) e por Meilgaard (1975) (0,1µg/L). Outros autores, no entanto, indicam um *threshold* mais alto, em torno de 0,1-0,3 µg/L (Ochiai et al., 2003) e 0,5 µg/L (Jamieson e Van Gheluwe, 1970).

O teor encontrado neste estudo é similar aos encontrados por Drost (1990) de 0,10 a 0,25 µg/L e por Scherer et al. (2008), com valores de 0,17 a 0,42 µg/L em cervejas brasileiras. Já Saison et al. (2009) encontrou em cervejas belgas frescas de 0,05 a 0,09 µg/L de trans-2-nonenal, enquanto que Hughes e Baxter (2001) obtiveram resultados de 0,01 a 2,0 µg/L do aldeído na bebida.

Pode-se notar também que o alto CV% entre lotes, chegando a 78,12% na amostra (I) Pilsen sem álcool, demonstra grande variação no controle deste aldeído para alguns fabricantes. Os CV% encontrados para as cervejas aqui analisadas em suas

triplicatas, são semelhantes aos obtidos por Vanderhaegen et al. (2007), de 1,96 a 7,57% para marcadores de envelhecimento de cervejas.

A Tabela 6 apresenta a comparação das médias do teor presente na cerveja tipo Pilsen, tipo Pilsen sem álcool e tipo Malzbier.

Tabela 6: Média do teor de trans-2-nonenal presente em cada tipo de cerveja analisado.

Tipo	Concentração (µg/L)	Desvio padrão	CV%
Pilsen	0,23 ^a	0,04	19,47
Pilsen sem Álcool	0,21 ^a	0,06	27,03
Malzbier	0,22 ^a	0,06	24,94

CV%: % coeficiente de variação para as médias obtidas para cada tipo de cerveja.
Letras iguais: não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Vanderhaegen et al. (2007) afirmam que a reação de Maillard é mais proeminente durante o envelhecimento de cervejas escuras e com maior teor alcoólico, pois possuem mais intermediários de reação, que são reativos para a formação de muitos e diferentes off-flavours.

Não foram encontradas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no teor de trans-2-nonenal entre os tipos de cerveja (Pilsen, Pilsen sem álcool e Malzbier). Este resultado poderia ser explicado, já que a concentração de aldeídos é afetada pela formação de aductos com aminoácidos e proteínas (Noel e Collin, 1995), assim como pelas diferenças na oxidação lipídica durante a produção e estocagem da cerveja, além de reações com álcool, água ou sulfito (Dufour et al., 1999). Vanderhaegen et al. (2007) também não encontraram diferença significativa no teor de aldeídos para cervejas escuras ou claras, com mais ou menos álcool.

A Tabela 7 apresenta a comparação das médias do teor de trans-2-nonenal presentes nos diferentes tipo de cerveja produzidos pelo mesmo fabricante.

Tabela 7: Média do teor de trans-2-nonenal presentes em diferentes tipos produzidos pelo mesmo fabricante

Marca	Tipo	Concentração (µg/L)	Desvio padrão	CV%
A	Pilsen	0,23 ^a	0,01	6,23
	-	-	-	-
	Malzbier	0,24 ^a	0,03	13,86
B	Pilsen	0,21 ^a	0,02	10,53
	Sem álcool	0,25 ^{ab}	0,01	4,84
	Malzbier	0,14 ^{ac}	0,03	17,69
D	Pilsen	0,16 ^a	0,05	30,45
	-	-	-	-
	Malzbier	0,26 ^b	0,08	31,23
F	-	-	-	-
	Sem álcool	0,13 ^a	0,01	5,90
	Malzbier	0,24 ^b	0,04	16,21

CV%: % coeficiente de variação.

Letras iguais: não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$) para cada marca de cerveja.

Em uma avaliação por fabricante, nota-se que a marca “B”, que produz os três tipos de cerveja analisados, mostra diferença significativa entre os tipos Pilsen sem álcool e Malzbier, enquanto que o tipo Pilsen não se diferenciou dos demais.

As cervejas tipos Pilsen sem álcool e Malzbier do fabricante “F” apresentam diferença significativa no teor de trans-2-nonenal, enquanto que a marca “D” apresenta diferença significativa entre os tipos Pilsen e Malzbier. Para a marca “A” não foi encontrada diferença significativa entre os tipos produzidos, Pilsen e Malzbier.

Estes resultados demonstram que na comparação do teor de trans-2-nonenal para os 3 tipos de cerveja avaliados, para todas as amostras analisadas, ou para um mesmo fabricante, não foi possível observar um padrão de teor maior ou menor para um determinado tipo, podendo indicar que a produção deste aldeído seja realmente mais dependente do tipo de armazenamento e estocagem a que a cerveja é exposta.

4. Conclusões

Os resultados da validação indicam que o método é preciso e exato na avaliação do trans-2-nonenal em cervejas.

As amostras analisadas apresentaram teor de trans-2-nonenal acima dos valores de *threshold* indicados por alguns autores, apesar de seus valores se apresentarem relativamente baixos, indicando que sua formação ainda não é totalmente controlada pelos fabricantes.

A concentração do aldeído entre as cervejas tipo Pilsen, tipo Pilsen sem álcool e tipo Malzbier não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$), já para um mesmo tipo de cerveja, o processo de fabricação e conservação utilizados por cada fabricante influi nas quantidades do composto encontradas nas cervejas.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida, e a Capes pela bolsa de estágio de doutorado, permitindo desenvolvimento de parte do trabalho em Portugal.

6. Referências Bibliográficas

- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- BAMFORTH, C.W. Making sense of flavor change in beer. v.37, n.2, p.165-171, 2000.
- BARRET, J., HASLEY, S. A., PEPPARD, T. L. Flavour stability of ales brewed using hydrolysed maize syrup-sensory and analytical aspects. **Journal of the The Institute of Brewing**, v. 89, p. 356, 1983.
- BELTRAN, J.; LÓPEZ, F.J.; HERNÁNDEZ, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 389–404, 2000.
- BROWN, J. W. Recent developments in flavour stability studies. **Ferment**, v.2, p. 51-53, 1989.
- DALGLIESH, C.E. Flavour stability. **Proceedings of the Brewery Convention**, v. 16, p.623-659, 1977.
- DEVREUX, A., BLOCKMANS, C., AND VAN DE MEERSCH, J. Carbonyl compounds formation during aging of beer. **European Brewery Convention**, v.7, p. 191-201, 1981.
- DROST, B. W., DUINDAM, J., HOEKSTRA, S. F., AND STRATING, J. Role of individual compounds in beer staling. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, V.11, p. 127-134, 1974.
- DROST B. W., VAN DEN BERG R., FREIJEE F. J. M., VAN DER VELDE E. G., AND HOLLEMANS M., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 48, n.4, p.124-131. 1990.
- DUFOUR, J. P., LEUS, M., BAXTER, A. J., HAYMAN, A. R. Characterization of the reaction of bisulfite with unsaturated aldehydes in a beer model system using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 138–144, 1999.
- GUIDO, L.F., BOIVIN, P., BENISMAIL, N., GONÇALVES, C.R., BARROS, A.A., **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 200–206, 2005.

GUYOT-DECLERCK, C.; FRANÇOIS, N.; RITTER, C.; GOVAERTS, B.; COLLIN S. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, v.16, p.157-162, 2005.

HUGHES, P. S., BAXTER, E. D. Beer: quality, safety and nutritional aspects. **Royal Society of Chemistry**, 2001

JAMIESON, A. M., VAN GHELUWE, J. E. A. Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, p.192–197. 1970.

KANEDA, H; TAKASHIO, M.; TAMAKI, T.; OSAWA, T. Influence of pH on flavour staling during beer storage **Journal of the The Institute of Brewing**, v.103, p. 21, 1997.

LIEGEOIS C, MEURENS N, BADOT C, COLLIN S. Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7634–7638, 2002.

MADIGAN D., PEREZ A., CLEMENTS M., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 56, p.146, 1998.

MCNAIR, H.M.; MILLER, J.M. Basic gas chromatography. **Wiley InterScience**, p.200, 1997.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v.12, p.151-168, 1975.

NARZISS, L. Centenary review – Technological factors of flavour stability. **Journal of the The Institute of Brewing**, v.92, n.4, p.346-353, 1986.

OCHIAI N., SASAMOTO K., DAISHIMA S., HEIDEN A. C., HOFFMANN A., **Journal of Chromatography A**, v. 986, n1, p.101. 2003.

PALAMAND, S. R., HARDWICK, W. A. Studies on the relative flavor importance of some beer constituents. **Technology Quarterly**, v. 6, n. 2, p.117–127, 1969.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. and SANTOS, L. H. M. L. M. Method ptimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 145–153, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, F. S. C.; Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAISON D., DE SCHUTTER D. P., UYTENHOVE B, DELVAUX F., DELVAUX F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1206–1215, 2009.

SANTOS J.R.; CARNEIRO J.R.; GUIDO L.F.; ALMEIDA P.J.; RODRIGUES J.A.; BARROS A.A.; Determination of *E*-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection Assay for the evaluation of beer ageing. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 395–402, 2003.

SCHERER R., WAGNER R., KOWALSKI C. H., GODOY, H. T., Method for (E)-2-nonenal analysis in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic coupled mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, aceito para publicação, 2009.

TRESSL, R., FRIESE, F., DENDESACK, F., KOPPLER, H. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of hop aroma constituents in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p.1422, 1978.

VAN EERDE, P., and STRATING, J. Trans-2-nonenal. In **European Brewery Convention** . – flavour symposium, p. 117–121, 1981.

VANDERHAESEN B., DELVAUX F., DAENEN L., VERACHTERT H., DELVAUX F. R., Aging characteristics of different beer types **Food Chemistry**, v. 103, p. 404-412. 2006

VESELY, P., LUSK, L., BASAROVA, G., SEABROOKS, J., RYDER, D., Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography / mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6941-6944, 2003.

YANG, K.-W.; EISERT, E.; LORD, H.; PAWLISZYN, J. Determination of pesticides in foods by automated SPME-GC-MS. In: PAWLISZYN, J. (ed.) **Applications of solid phase microextraction**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 435-447, 1999

WACKERBAUER K., HARDT R., Radical reactions and flavour stability of beer. **Braun International**, v. 4, p. 320, 1997.

WANG P. S., SIEBERT K. J., **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.32, p.47, 1974

ZHANG, Z.; YANG, M.J.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction:a new solvent-free alternative for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 844A-853A, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

O método desenvolvido para detecção e quantificação de folatos (ácido fólico, 10-metil ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato, 5-formiltetraidrofolato e 10-formil ácido fólico) em cervejas demonstrou ser preciso e exato, com cromatograma das amostras apresentando os folatos estudados bem separados. Os parâmetros de validação avaliados apresentaram recuperação e coeficientes de variação adequados às exigências dos órgãos reguladores, e as curvas de calibração obtidas apresentaram coeficiente de correlação indicando excelente ajuste dos dados para a linha de regressão.

Os folatos 10-metil ácido fólico, 5-metiltetraidrofolato e 10-formil ácido fólico foram encontrados em todas as cervejas analisadas. As concentrações encontradas indicam a cerveja como um alimento auxiliar à ingestão diária recomendada de folatos, devendo porém, ser consumida com moderação. A cerveja sem álcool apresentou teor de folatos totais semelhante às cervejas alcoólicas, podendo ser ingerida por gestantes quando completamente livre de álcool.

Durante a vida de prateleira da cerveja o teor presente de folatos decai, mas esta redução não é dependente do tipo de embalagem utilizada. De modo geral, o 10-metil ácido fólico parece ser o folato mais estável ao longo do tempo, e o 5-metiltetraidrofolato que apresentou maiores variações em sua concentração, possui indicações de ser o mais instável.

Quanto à concentração de compostos fenólicos nas cervejas brasileiras, a cerveja Malzbier apresentou o maior teor de fenólicos totais presentes, assim como a maior capacidade antioxidante. A cerveja sem álcool é o tipo que mais apresentou diferenças nestes parâmetros entre as marcas analisadas de um mesmo tipo de cerveja. Foi encontrada relação direta entre o teor de fenólicos totais e os ensaios realizados nas cervejas, o que indica uma forte influência destes compostos sobre a capacidade antioxidante da bebida. Na comparação da influência do tipo de embalagem utilizada, houve relevância somente para a cerveja Pilsen. Os resultados obtidos do estudo indicam que devendo ser consumida com moderação, a cerveja pode ser um alimento auxiliar como fonte de compostos fenólicos.

No estudo das quantidades de trans-2-nonenal presentes na cerveja brasileira, os resultados da validação indicam que o método por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas é preciso e exato. As amostras analisadas apresentaram teor

de trans-2-nonenal acima do *threshold* demonstrado por alguns autores, indicando que o controle da formação do aldeído ainda não é totalmente eficiente.

A concentração do trans-2-nonenal entre as cervejas tipo Pilsen, tipo Pilsen sem álcool e tipo Malzbier não apresentou diferença, já para um mesmo tipo de cerveja, o processo de fabricação e conservação utilizado pelos fabricantes influi nas quantidades do composto encontradas nas amostras.

APÊNDICES

Apêndice 1

Tabela 1: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Pilsen armazenada em lata.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
A	1	8,49	6,35	5,39	5,88	2,38	11,24	5,50	2,35	10,60	3,06	3,79	10,69
		8,51	6,57	5,41	6,12	2,43	11,54	5,61	2,41	10,66	3,09	3,69	10,62
		8,55	7,05	4,83	5,80	2,40	11,85	5,58	2,42	10,55	3,22	3,72	10,64
A	2	2,45	4,44	9,88	4,29	2,70	8,47	3,90	3,21	8,35	3,27	3,45	6,61
		2,79	6,24	11,62	4,19	4,08	9,29	3,97	3,26	8,27	3,32	4,04	6,56
		2,21	4,33	8,24	3,86	4,03	8,58	3,85	3,34	8,31	3,21	3,96	6,60
A	3	7,07	4,12	6,57	5,26	3,19	4,56	4,89	2,91	4,27	3,38	3,82	4,41
		7,08	4,75	5,85	4,72	3,62	4,28	4,86	3,04	4,30	3,43	3,66	4,06
		7,15	4,87	5,79	5,30	3,66	4,52	4,75	2,93	4,09	3,39	3,73	3,91
B	1	6,81	7,33	6,66	5,26	4,75	6,76	3,85	3,89	6,39	3,77	3,68	7,22
		5,71	7,25	6,57	4,17	5,62	6,83	4,00	4,00	6,44	3,33	3,82	6,05
		6,85	7,15	6,50	4,19	5,55	6,66	3,97	4,12	6,43	3,53	3,65	6,01
B	2	9,45	8,51	6,11	4,79	6,91	4,22	4,57	5,33	3,98	3,65	4,05	5,47
		8,15	8,35	6,57	4,39	6,77	4,58	4,63	5,37	4,05	3,55	4,30	5,21
		8,79	7,88	7,45	4,68	7,92	4,44	4,46	5,43	4,11	3,68	4,13	5,21
B	3	8,92	8,33	7,54	4,81	8,69	4,41	4,62	6,42	4,15	3,35	4,94	5,41
		9,04	6,43	7,41	4,33	8,96	4,49	4,65	6,49	4,25	3,51	4,96	5,00
		9,01	6,32	7,28	5,05	9,06	5,03	4,71	6,57	4,22	3,50	4,98	5,08
C	1	7,08	4,39	6,83	4,36	5,25	5,30	4,53	4,17	5,23	3,29	5,23	5,18
		6,87	4,45	6,01	4,30	5,33	5,75	4,59	4,19	5,15	3,09	3,14	5,02
		7,32	5,12	6,07	4,26	5,37	5,22	4,65	4,13	5,18	3,26	3,36	4,95
C	2	5,11	9,85	5,48	6,73	6,16	4,17	4,78	4,78	4,45	3,34	3,91	4,35
		5,04	6,93	5,06	6,77	6,31	4,10	4,86	4,84	4,47	3,27	3,98	4,64
		6,26	7,46	5,31	6,61	5,86	3,93	4,89	4,89	4,38	3,19	3,46	4,63
C	3	4,93	8,00	6,77	4,14	6,78	5,30	5,18	5,18	4,99	5,14	4,72	5,21
		4,64	7,44	7,05	3,91	7,14	4,90	5,30	5,33	4,82	5,14	5,33	5,38
		4,99	7,02	6,97	4,43	9,29	5,03	5,39	5,30	4,71	5,17	5,26	5,34
D	1	6,40	6,81	9,36	4,49	7,42	7,08	4,25	5,68	6,66	2,74	4,59	6,45
		6,24	7,06	8,89	4,35	7,11	6,63	4,37	5,73	6,63	2,84	4,34	6,45
		6,20	6,51	9,46	4,65	6,95	6,55	4,58	5,77	6,57	2,81	4,41	6,10
D	2	3,00	7,88	6,95	3,94	7,20	4,34	3,85	5,47	3,89	3,26	4,79	3,82
		3,15	8,24	6,95	4,12	7,12	4,18	3,77	5,51	3,90	3,10	4,77	3,73
		3,37	8,03	7,14	4,17	7,82	3,84	3,66	5,36	3,81	3,13	4,69	3,69
D	3	5,49	9,94	5,85	5,44	6,28	4,02	5,10	4,91	3,76	2,86	4,59	3,28
		5,80	9,64	5,48	5,11	6,72	3,64	5,18	4,99	3,38	2,84	4,58	3,18
		5,56	9,69	5,51	4,77	6,77	3,89	6,14	5,03	3,49	2,78	4,63	3,32
E	1	6,16	11,94	9,46	5,67	6,30	7,29	4,62	4,97	6,14	3,53	5,70	6,15
		6,27	13,82	8,82	5,05	7,05	7,09	4,67	5,11	6,16	3,55	5,72	6,19
		5,66	12,95	9,05	5,10	6,87	6,63	4,78	5,15	6,09	3,49	5,54	6,09
E	2	7,87	11,65	7,02	5,00	5,94	5,69	4,37	4,68	6,05	3,79	5,63	5,87
		8,72	11,43	7,04	5,23	5,88	6,43	4,59	4,71	6,06	3,89	4,91	5,93
		8,45	11,54	7,01	5,33	6,05	6,35	4,65	4,64	6,03	3,91	4,95	5,85
E	3	6,41	14,62	7,83	4,95	6,49	6,05	4,51	5,02	5,68	3,60	5,54	5,99
		6,34	11,71	8,25	5,44	6,51	6,27	4,38	4,94	5,72	3,66	5,40	5,91
		6,57	10,48	8,17	5,27	6,87	6,53	4,46	4,91	5,80	3,75	5,46	5,89

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.

Apêndice 2

Tabela 2: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Pilsen sem álcool armazenada em lata.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
G	1	10,93	7,17	8,19	10,58	5,25	7,33	8,09	5,26	6,97	6,47	4,59	6,63
		10,96	7,79	8,39	10,34	5,52	7,38	8,19	5,46	7,22	6,60	4,44	6,81
		11,40	10,13	8,17	11,02	5,54	7,51	8,04	5,33	6,96	6,72	4,50	6,90
		11,40	7,89	9,53	7,84	2,65	7,01	8,31	5,85	8,44	6,93	4,36	6,87
G	2	11,32	8,20	9,40	10,06	2,56	6,75	8,59	5,18	8,35	6,86	4,29	6,93
		11,37	8,20	10,05	10,22	3,31	7,03	8,57	5,83	8,33	6,83	4,43	6,74
		10,52	9,72	9,39	9,62	2,81	7,19	8,13	5,97	8,31	7,04	4,05	6,68
		11,25	7,71	9,54	9,57	3,29	7,21	8,07	6,43	8,27	7,10	4,58	6,81
G	3	10,86	8,55	9,39	9,83	3,06	7,74	8,07	6,55	8,24	7,17	4,44	6,75
		9,52	2,64	10,69	9,89	3,23	11,44	9,17	2,94	10,38	7,22	2,23	9,26
		9,53	3,18	10,88	9,40	3,24	10,58	9,09	3,00	10,47	7,28	2,53	9,08
		10,03	2,73	10,91	9,41	3,39	10,99	8,96	3,08	10,38	7,56	2,51	8,93
B	1	9,48	4,31	8,23	9,20	3,84	9,86	8,61	3,20	9,39	7,84	2,90	8,70
		9,58	4,42	8,30	8,97	3,65	8,98	8,48	3,27	9,45	7,96	3,20	8,38
		9,66	4,34	8,69	8,79	2,93	9,73	8,64	3,33	9,31	8,11	3,15	8,74
		9,81	4,58	9,58	9,02	2,82	9,79	8,16	2,74	8,88	7,04	2,81	8,06
B	2	9,43	4,40	9,71	8,32	3,24	9,15	8,36	2,95	8,96	7,11	2,69	8,12
		9,85	4,74	9,40	9,05	2,56	10,48	8,48	2,83	8,91	7,42	2,67	7,97
		5,09	1,57	5,53	6,01	2,14	3,19	5,63	2,25	2,94	4,01	1,30	3,51
		5,07	1,65	5,54	5,60	2,03	3,16	5,70	1,92	3,01	3,63	1,38	3,11
H	1	5,83	1,52	5,40	5,70	1,68	3,31	5,96	1,96	3,04	3,98	1,35	3,00
		6,08	1,19	5,32	5,98	1,46	3,19	5,18	1,89	3,16	3,85	1,51	2,53
		6,43	1,33	5,18	5,75	1,62	3,29	5,37	1,87	3,20	3,80	1,50	2,40
		6,44	0,88	5,16	5,88	1,59	3,20	5,26	1,91	3,23	3,81	1,45	2,55
H	2	6,48	3,48	3,58	5,69	1,64	3,25	5,43	1,73	2,92	3,35	1,59	2,16
		5,96	1,69	3,61	5,76	1,49	3,02	5,37	1,63	2,93	4,32	1,51	2,10
		5,91	1,46	3,54	5,67	1,47	2,83	5,63	1,63	2,93	4,37	1,44	2,23
		7,14	1,02	4,29	7,16	1,35	7,12	6,32	1,63	6,09	6,09	1,61	6,78
I	1	6,84	1,31	4,53	7,03	1,17	6,47	6,36	1,70	6,03	6,47	1,68	7,03
		6,83	1,18	4,32	7,10	1,58	6,28	6,22	1,69	6,05	5,74	1,82	6,84
		7,14	1,69	5,26	6,53	1,21	7,37	6,51	1,63	6,93	6,89	1,59	6,25
		7,25	1,56	5,23	6,64	1,15	6,52	6,66	1,54	6,81	7,06	1,51	6,32
I	2	7,55	1,54	4,82	6,31	0,45	5,95	6,43	1,57	6,58	7,64	1,58	6,12
		7,08	2,17	4,53	6,64	0,24	6,21	6,32	1,16	5,83	6,72	1,81	5,70
		6,78	1,67	4,51	7,02	0,72	5,66	6,16	1,14	5,62	6,61	1,88	5,63
		7,37	2,07	4,40	6,67	0,56	5,82	6,38	1,23	5,75	6,74	1,83	5,76
F	1	7,07	3,83	4,38	6,54	1,83	2,71	6,12	2,09	2,55	6,95	2,00	2,16
		7,04	3,43	4,72	6,86	1,89	1,71	6,36	2,17	2,62	6,70	2,12	2,08
		6,74	3,87	4,55	5,66	1,77	2,97	6,22	2,03	2,43	6,61	2,04	2,24
		6,20	3,62	4,49	5,73	0,76	2,75	5,33	1,54	2,52	5,69	1,74	2,08
F	2	6,33	3,84	4,34	5,49	0,99	2,63	5,45	1,56	2,55	5,72	1,82	2,01
		6,10	3,83	4,17	5,66	0,65	2,67	5,17	1,17	2,51	5,45	1,82	1,93
		7,45	2,64	4,55	5,63	0,55	2,58	5,15	1,38	2,47	5,36	1,60	2,15
		7,34	2,46	4,90	5,56	0,53	2,77	5,31	1,27	2,39	5,40	1,59	2,20
F	3	7,62	2,72	4,72	5,36	0,78	3,04	5,26	1,30	2,50	5,34	1,58	2,26

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.

Apêndice 3

Tabela 3: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Malzbier armazenada em lata.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
A	1	4,64	6,00	6,75	5,95	9,15	3,58	5,63	6,67	3,32	5,11	6,23	3,47
		5,64	6,40	6,43	5,44	8,03	3,81	5,83	6,61	3,55	4,63	6,26	3,73
		4,59	6,45	6,56	4,94	8,64	4,13	5,45	6,42	3,84	5,01	6,03	3,67
A	2	3,83	6,30	6,61	6,08	9,69	3,65	5,11	7,07	3,38	4,65	6,13	3,34
		3,60	5,44	6,13	5,40	9,09	3,61	5,15	6,97	3,41	4,58	6,10	3,44
		4,83	5,54	6,77	5,52	9,10	3,72	5,30	6,90	3,43	4,75	6,05	3,69
A	3	6,33	2,87	3,43	7,54	5,97	3,76	7,07	5,02	3,47	6,24	5,89	3,48
		6,35	2,40	3,38	7,49	5,56	3,77	7,20	4,93	3,53	6,01	5,95	3,34
		6,23	1,89	3,34	7,10	5,92	3,83	7,31	4,38	3,60	5,79	5,93	3,68
B	1	2,43	13,67	5,85	5,34	3,84	8,77	5,18	3,37	8,31	5,25	3,97	6,81
		2,19	12,84	5,56	5,31	3,61	8,96	5,30	3,41	8,41	5,33	3,83	6,80
		2,58	13,22	5,72	4,65	3,36	9,10	5,50	3,46	8,34	5,15	3,61	6,93
B	2	8,17	9,23	5,30	6,22	5,99	7,48	4,37	4,15	7,10	4,55	4,22	6,25
		5,04	6,42	4,90	4,78	5,10	7,74	4,58	4,32	7,14	4,75	4,33	6,29
		7,47	6,73	5,32	6,48	5,26	7,64	4,65	4,25	7,01	4,68	4,62	6,49
B	3	8,37	4,92	3,61	7,39	4,94	4,64	7,81	4,65	4,31	5,77	4,20	4,85
		9,18	3,24	3,08	7,78	5,26	4,89	7,63	4,68	4,35	6,18	4,13	4,75
		8,15	3,05	3,67	7,41	5,97	4,81	7,52	4,72	4,31	6,01	4,19	4,64
F	1	4,46	8,00	9,76	6,79	5,05	10,04	6,23	4,06	9,45	5,74	4,26	9,81
		4,27	7,63	9,62	6,04	4,02	9,88	6,19	4,14	9,51	5,61	4,36	9,57
		4,30	7,78	9,63	7,44	3,34	10,10	6,22	4,19	9,56	5,74	4,19	9,69
F	2	4,87	9,32	7,80	5,21	4,21	9,52	5,05	3,56	8,98	4,53	3,97	9,32
		5,43	9,04	7,94	5,44	3,90	9,58	4,97	3,60	9,02	4,65	3,58	9,25
		5,49	9,31	7,21	4,04	4,14	9,79	4,81	3,61	8,91	4,78	3,72	9,22
F	3	5,61	10,54	5,54	4,71	7,94	10,67	5,17	5,95	9,92	4,42	4,33	8,90
		5,98	9,47	6,19	5,57	8,05	10,58	4,86	6,02	9,96	4,35	4,40	8,97
		5,84	10,37	5,81	5,85	7,81	10,04	4,97	5,99	9,75	4,22	4,47	9,00
D	1	5,64	8,52	7,90	6,44	2,77	5,56	4,35	3,30	5,06	5,75	3,83	5,48
		6,21	2,58	8,62	5,67	3,14	5,08	5,66	3,35	5,11	5,75	3,69	5,57
		5,81	8,00	8,44	6,19	3,31	5,14	5,31	3,41	5,14	5,89	3,67	5,53
D	2	2,68	6,93	8,89	5,72	3,65	5,88	3,58	3,46	5,13	4,06	3,97	5,67
		3,37	7,30	9,03	5,53	4,01	5,19	3,24	3,54	5,00	3,86	3,96	5,78
		2,73	7,28	8,84	5,37	4,33	5,22	2,72	3,59	5,05	3,83	3,99	5,76
D	3	5,68	9,83	5,40	4,52	6,21	10,86	5,31	5,30	9,75	5,62	4,58	9,57
		5,14	9,71	5,34	5,24	7,29	10,35	5,23	5,40	9,89	5,60	4,63	9,68
		4,99	9,92	5,59	4,58	7,29	11,12	5,34	5,45	9,68	5,74	4,56	9,63

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.

Apêndice 4

Tabela 4: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Pilsen armazenada em garrafa.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
A	1	6,67	10,77	6,00	5,95	7,35	5,13	6,70	5,70	5,10	6,41	4,98	5,08
		7,07	11,25	6,40	5,91	7,23	5,12	6,75	5,68	5,11	5,78	5,15	5,18
		7,05	11,01	6,27	5,99	7,40	5,14	6,58	5,60	5,07	5,64	5,12	5,22
A	2	8,38	9,73	5,89	6,80	7,99	5,53	8,17	5,44	5,27	6,19	5,17	5,09
		8,07	9,82	6,37	7,00	8,23	5,58	7,81	5,50	5,21	6,27	5,22	5,31
		8,21	9,13	5,95	6,84	7,94	5,49	7,79	5,49	5,22	5,95	5,12	5,33
A	3	5,78	4,76	4,58	7,18	9,10	4,22	7,96	5,75	4,08	6,44	5,20	4,09
		5,71	4,47	5,10	6,44	8,88	4,07	7,93	5,83	4,15	6,54	5,18	4,26
		5,84	4,57	4,67	6,84	9,71	4,09	7,81	5,77	4,16	6,41	5,17	4,28
B	1	6,77	15,66	5,47	6,69	8,84	5,71	6,59	7,13	6,23	6,47	6,62	6,13
		5,86	15,65	5,53	6,61	9,90	5,63	6,67	7,20	6,16	6,30	7,25	6,22
		5,73	15,35	5,54	6,64	10,75	5,21	6,75	7,24	6,14	6,17	7,32	6,19
B	2	6,24	15,21	5,69	6,93	10,04	5,43	7,97	7,81	5,07	7,04	7,36	5,75
		5,98	15,46	5,85	7,97	10,83	5,43	7,81	7,89	5,11	6,94	7,30	5,79
		5,76	16,08	5,88	7,28	10,79	5,95	7,73	7,95	5,14	6,77	7,44	5,65
B	3	6,63	15,18	10,72	7,52	10,74	6,22	6,63	7,74	5,87	5,95	7,39	6,30
		5,43	15,43	9,48	6,73	9,91	6,18	6,59	7,68	6,12	6,18	7,41	6,06
		5,96	15,63	10,82	6,74	11,33	6,27	6,51	7,84	6,08	5,64	7,30	6,12
C	1	7,03	8,85	7,44	5,76	6,93	4,99	6,94	5,89	5,05	6,44	5,01	5,26
		7,01	8,86	7,43	5,70	6,86	5,13	6,71	5,85	5,08	6,00	5,13	5,36
		6,95	8,97	7,26	5,86	7,10	4,92	6,75	5,85	4,99	5,75	5,24	5,29
C	2	6,45	9,58	7,09	5,93	7,91	4,48	6,71	5,98	4,78	5,84	5,28	4,61
		6,67	9,46	7,03	5,91	7,54	4,78	6,80	6,02	4,78	5,64	5,34	4,68
		6,80	9,33	7,14	5,98	8,14	4,69	6,91	6,10	4,71	5,78	5,46	4,58
C	3	4,79	6,94	5,79	5,63	7,19	3,88	6,12	5,85	4,50	6,47	5,18	4,29
		5,01	5,91	5,75	5,89	7,32	3,74	6,32	5,89	4,39	6,30	5,12	4,26
		4,54	5,91	5,72	5,82	7,66	3,83	6,38	5,81	4,42	6,25	5,24	4,25
D	1	6,81	9,00	7,25	6,66	6,48	6,51	6,71	5,12	6,01	6,47	5,00	6,10
		6,94	8,90	7,31	6,69	6,75	6,22	6,76	5,19	6,11	6,30	5,08	6,25
		6,71	8,97	7,46	6,66	6,61	6,32	6,96	5,16	6,08	6,24	5,11	6,30
D	2	5,14	9,62	6,05	6,37	6,11	5,94	6,38	5,26	6,08	6,41	5,18	6,00
		5,63	10,15	6,34	6,66	6,38	5,88	6,30	5,22	5,88	6,46	5,11	6,01
		5,19	9,67	6,43	6,71	6,17	5,87	6,43	5,20	5,87	6,43	5,04	5,98
D	3	5,47	11,04	6,87	6,56	6,81	6,10	6,10	5,32	5,74	6,25	5,17	5,57
		5,61	10,67	7,52	6,79	7,02	6,18	6,27	5,36	5,81	5,90	5,14	5,61
		5,74	10,80	7,02	6,73	6,87	6,27	6,31	5,41	5,71	6,47	5,23	5,52
E	1	7,30	16,25	10,85	5,55	15,29	9,33	7,27	7,75	9,83	6,60	7,25	8,90
		7,37	17,05	10,72	5,99	16,16	9,41	6,74	8,73	9,39	6,47	8,00	9,56
		7,68	16,43	10,56	5,50	15,42	9,22	6,96	8,34	9,53	6,30	8,05	9,46
E	2	8,57	9,86	10,56	6,25	12,11	7,86	5,82	7,28	8,62	5,62	7,24	8,90
		7,78	9,78	11,06	6,95	11,81	7,96	5,76	7,29	8,59	5,51	7,40	9,01
		7,45	10,08	10,96	6,79	12,08	8,94	5,79	7,33	8,61	5,60	7,46	8,96
E	3	7,27	17,96	9,90	7,71	17,35	8,36	7,18	10,27	5,79	7,67	10,07	5,37
		8,57	17,80	9,56	8,23	17,07	8,43	7,04	10,30	5,87	7,52	9,80	5,56
		7,17	17,86	9,49	8,00	17,67	8,41	7,12	10,36	5,84	7,60	9,74	5,52

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.

Apêndice 5

Tabela 5: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Pilsen sem álcool armazenada em garrafa.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
G	1	7,21	7,94	9,11	7,26	9,75	6,48	7,81	7,68	6,03	7,16	6,38	5,56
		6,88	8,06	7,56	8,42	8,76	6,55	7,79	7,70	6,11	6,94	6,64	5,93
		7,08	8,17	7,82	8,68	8,78	6,50	7,97	7,78	5,66	6,72	6,90	5,92
G	2	10,83	8,99	6,39	8,91	11,84	6,47	7,84	8,48	6,12	7,40	8,01	6,17
		11,03	12,24	6,44	8,39	12,64	6,46	7,65	8,60	6,17	7,22	8,30	6,12
		11,20	10,91	7,00	7,55	12,02	6,44	7,45	8,55	6,14	6,85	8,16	6,29
G	3	10,75	10,78	6,95	7,80	10,54	6,34	7,23	10,27	5,94	7,66	9,53	6,00
		10,88	9,98	6,71	7,52	10,12	6,16	7,31	10,31	5,81	7,52	9,56	6,17
		10,70	11,03	6,90	8,07	9,95	5,98	7,34	10,29	5,74	7,38	9,70	6,05
B	1	10,06	29,40	8,07	9,18	28,35	6,92	8,49	20,21	7,03	7,66	19,61	6,81
		10,25	29,90	8,12	8,48	28,55	7,00	7,97	19,47	7,11	7,63	19,67	6,90
		10,15	29,16	7,75	8,59	29,04	6,66	7,92	19,55	7,07	7,54	19,74	6,87
B	2	10,53	17,74	6,23	9,83	15,59	4,85	9,17	12,66	4,47	8,13	13,49	4,74
		10,75	16,82	6,40	9,88	15,77	4,77	9,29	13,21	4,53	7,94	13,41	4,68
		11,06	16,81	6,38	9,40	15,49	4,82	9,12	13,31	4,58	7,84	13,43	4,82
B	3	10,55	16,35	6,48	10,09	15,26	5,57	8,92	13,26	5,15	8,18	13,46	5,24
		9,73	17,08	6,43	9,38	15,60	5,46	9,01	13,47	5,18	8,36	13,53	5,35
		10,49	16,48	6,10	9,66	15,45	5,61	8,89	13,52	5,25	7,83	13,45	5,28
H	1	6,28	7,62	2,83	4,90	3,32	2,29	4,63	3,02	2,06	4,54	3,56	3,00
		5,67	7,61	2,79	4,97	3,20	2,30	4,57	3,07	2,11	4,55	3,66	2,78
		5,93	7,51	3,01	5,11	3,36	2,33	4,83	2,97	2,14	4,42	3,56	2,72
H	2	6,13	7,59	3,41	5,01	2,81	2,60	4,71	2,68	2,38	4,79	2,90	2,64
		6,01	8,13	3,52	5,31	3,04	2,83	4,59	2,60	2,50	4,67	2,81	2,57
		6,00	8,08	3,66	5,37	2,81	2,65	4,65	2,57	2,44	5,06	2,69	2,53
H	3	6,90	5,91	2,61	5,60	3,29	2,18	5,17	2,95	1,96	5,25	2,67	1,97
		6,00	6,47	2,58	5,18	3,31	2,32	5,10	2,87	2,11	5,34	2,74	2,07
		6,53	6,23	2,51	5,49	3,62	2,10	4,94	2,91	1,90	5,26	2,80	2,00
I	1	6,60	6,00	3,43	6,24	2,26	2,42	5,69	2,28	2,37	5,13	2,37	2,66
		6,84	5,98	3,74	5,80	2,23	4,22	5,86	2,35	2,29	5,37	2,30	2,72
		6,81	6,16	3,25	6,32	2,41	4,00	5,98	2,32	2,25	5,22	2,62	2,82
I	2	7,64	4,74	4,99	7,02	1,85	3,32	6,51	2,04	3,05	5,75	2,73	3,64
		7,51	6,14	4,86	6,61	1,95	3,66	6,63	2,23	3,19	6,19	2,80	3,48
		7,35	5,70	4,83	6,86	2,03	3,54	6,79	2,12	2,54	6,32	2,50	3,53
I	3	7,04	1,77	4,08	6,70	1,82	3,61	6,32	2,07	3,33	6,30	2,73	3,38
		7,10	2,06	4,32	6,21	1,97	3,57	6,35	2,08	3,35	6,25	2,38	3,28
		7,07	3,17	4,12	6,41	1,84	3,44	6,30	2,04	3,26	6,13	2,33	3,36
F	1	8,22	3,51	4,13	7,88	2,66	4,21	7,31	2,51	3,92	7,22	2,36	3,53
		8,15	3,41	3,82	7,54	3,03	3,80	7,45	2,55	3,86	7,04	2,62	3,48
		8,35	3,38	4,09	7,46	3,14	3,87	7,39	2,64	3,84	6,84	2,32	3,50
F	2	7,97	2,83	4,05	7,87	3,06	3,56	7,31	2,79	3,35	7,18	2,41	3,64
		8,07	2,98	4,39	7,46	3,42	3,94	7,30	2,81	3,43	7,00	2,47	3,72
		8,25	3,51	4,05	7,84	3,60	3,79	7,44	2,84	3,38	7,12	2,61	3,60
F	3	6,84	7,62	6,42	6,54	7,22	4,77	6,08	5,58	4,36	6,35	5,72	3,85
		6,64	7,52	6,61	6,56	7,09	4,52	6,10	5,63	4,51	6,42	5,85	4,07
		6,68	6,76	6,01	6,48	7,88	4,43	6,06	5,69	4,44	6,52	5,68	4,22

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.

Apêndice 6

Tabela 6: Concentrações ($\mu\text{g}/100\text{mL}$) dos folatos analisados em cerveja Malzbier armazenada em garrafa.

Amostra	Lote	T0			T2			T4			T6		
		10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil	10 Metil	5 Metil	10 Formil
A	1	2,39	13,50	6,32	4,23	9,09	6,02	3,97	7,05	5,62	4,65	6,41	5,36
		2,08	13,84	6,38	4,12	9,01	5,92	4,25	6,96	5,05	4,56	6,63	5,24
		2,18	13,82	6,35	3,91	9,53	5,87	4,17	6,52	5,17	4,58	7,02	5,11
		3,59	5,99	5,01	4,07	9,72	4,53	4,26	7,08	4,64	4,79	7,39	4,46
A	2	3,63	5,29	5,48	4,48	9,24	5,00	4,19	7,05	4,79	4,42	7,26	4,52
		4,16	5,40	5,33	4,29	9,45	4,69	4,03	7,02	4,71	4,53	7,62	4,40
		7,87	4,86	5,71	6,79	9,95	4,98	6,27	7,21	4,62	5,37	7,09	4,58
		7,52	4,57	5,81	6,38	10,05	5,00	6,10	7,28	4,70	6,46	7,24	4,49
A	3	7,07	3,71	5,81	5,98	9,89	5,19	6,35	7,18	4,77	6,54	7,27	4,47
		5,30	9,25	6,48	5,18	8,98	3,99	3,84	6,63	3,74	3,53	6,69	4,00
		5,19	9,61	6,23	3,83	8,56	3,50	3,80	6,56	3,76	3,65	6,55	3,85
		6,13	9,57	6,29	4,22	9,37	3,93	4,00	6,52	3,75	3,69	6,52	3,91
B	1	5,61	9,76	3,97	5,14	9,28	4,22	4,03	6,80	3,93	3,75	6,48	3,89
		5,24	7,33	4,14	4,12	9,15	4,18	3,97	6,89	3,86	3,87	6,36	3,88
		5,64	8,06	4,11	4,03	9,18	4,30	3,84	6,69	3,88	3,58	6,41	3,88
		5,37	8,32	4,02	5,53	8,93	4,39	5,15	6,59	4,09	4,37	6,30	4,76
B	2	5,23	8,02	4,15	5,18	9,37	4,43	5,11	6,55	4,14	4,42	6,17	4,64
		5,20	8,65	4,17	5,69	9,22	4,25	5,37	6,89	4,07	4,64	6,33	4,70
		6,34	14,27	5,90	6,19	13,84	6,98	5,67	12,51	6,70	5,51	12,68	6,19
		6,24	14,82	6,90	6,34	12,91	7,00	5,82	12,32	6,93	5,37	12,79	6,22
F	1	6,08	14,23	6,42	6,69	13,27	7,06	5,50	12,47	6,85	5,45	12,87	6,31
		5,43	12,46	8,63	5,46	11,60	6,70	5,15	11,67	6,29	5,25	11,72	6,25
		4,77	12,67	9,71	5,36	10,89	6,93	5,10	11,64	6,50	5,18	11,90	6,24
		5,46	12,75	9,31	4,53	10,93	6,86	4,93	11,55	6,47	5,34	11,94	6,14
F	2	7,38	10,99	8,43	7,44	10,31	8,08	6,88	10,17	7,65	5,74	10,74	7,12
		7,20	12,04	9,01	7,74	10,23	8,49	7,03	10,29	7,81	6,19	10,36	7,65
		8,09	11,89	9,56	7,64	10,07	8,88	6,99	10,19	7,73	6,02	10,32	7,36
		7,21	18,78	8,75	7,32	10,68	7,75	6,92	7,79	7,35	6,47	7,25	7,24
D	1	6,85	17,31	8,54	7,33	10,32	8,06	7,10	7,74	7,26	6,30	7,12	7,37
		7,28	19,38	9,63	7,06	10,18	7,63	6,76	7,70	7,38	6,25	7,38	7,31
		6,43	10,21	6,05	6,02	10,26	7,55	6,48	7,60	7,22	6,41	7,32	7,23
		5,88	10,13	7,04	6,70	10,70	7,84	6,59	7,68	7,14	5,75	7,28	7,38
D	2	7,07	9,03	6,07	5,95	10,80	8,18	6,46	7,60	7,00	6,19	7,27	7,36
		6,90	8,82	7,99	5,92	10,37	8,47	5,61	7,81	7,91	6,40	7,29	7,67
		7,03	9,75	7,77	6,02	10,62	8,37	5,50	7,73	8,00	6,27	7,17	7,83
		6,45	9,04	8,26	6,60	10,64	8,38	5,54	7,78	8,08	6,19	7,14	8,12
J	1	5,61	4,53	3,63	4,48	4,87	3,08	4,07	4,00	2,87	4,41	3,83	2,58
		4,94	3,81	3,50	4,25	4,55	3,05	4,25	3,81	2,93	4,47	3,72	2,51
		4,60	4,64	3,68	4,71	4,95	2,80	3,97	3,96	2,90	4,50	3,85	2,44
		4,87	4,40	2,94	6,51	5,09	4,15	5,96	4,14	3,87	5,37	4,65	3,00
J	2	5,93	4,31	3,13	5,56	4,99	4,23	6,03	4,19	3,92	6,30	4,57	3,14
		5,11	4,49	3,23	5,34	4,85	4,04	5,30	4,22	3,97	5,23	4,53	3,06
		6,27	3,74	3,66	5,67	3,77	4,18	5,18	3,92	3,92	5,45	3,82	2,94
		6,43	3,69	4,14	6,01	3,95	4,10	5,46	3,98	3,88	6,41	3,67	3,16
J	3	5,97	3,97	4,12	5,99	3,79	4,19	5,43	3,93	3,86	5,37	3,75	3,07

T0: recém fabricada, T2: após 2 meses de fabricação, T4: após 4 meses de fabricação, T6: após 6 meses de fabricação.