



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

JERÔNIMO RAIMUNDO DE OLIVEIRA NETO

**Potencial Antioxidante e Atividade Vasodilatadora de Cervejas
Comerciais**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

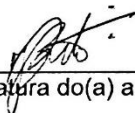
Nome completo do autor: Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto

Título do trabalho: Potencial Antioxidante e Atividade Vasodilatadora de Cervejas Comerciais

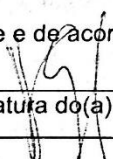
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 13/08/18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

JERÔNIMO RAIMUNDO DE OLIVEIRA NETO

**Potencial Antioxidante e Atividade Vasodilatadora de
Cervejas Comerciais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Co-orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira Neto, Jerônimo Raimundo de
Potencial Antioxidante e Atividade Vasodilatadora de Cervejas
Comerciais [manuscrito] / Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto. - 2017. xx, 93 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil; co-orientador Dr. Boniek
Gontijo Vaz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia
(FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. cerveja. 2. potencial antioxidante. 3. vasodilatação. 4. compostos fenólicos. 5.
Lúpulo. I. Gil, Eric de Souza, orient. II. Título.

CDU 544.6



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE

Aluno (a): Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto

Orientador (a): Prof. Dr. Eric de Souza Gil

Título da Dissertação: "Potencial antioxidante e atividade vasodilatadora de cervejas comerciais".

Data: 05/05/2017

Horário: 14:00 horas

Local: Mini auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Eric de Souza Gil (FF/UFG) <i>Presidente</i>	<i>APROVADO</i>	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>José Realino de Paula</i>
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr. Paulo César Ghedini (ICB/UFG)	<i>APROVADO</i>	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira (DQ/UFES)	<i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>
Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos - Suplente (FF/UFG)		
Profª. Drª. Telma Alves Garcia – Suplente (FF/UFG)		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado <i>Aprovado</i>	<i>[Assinatura]</i>



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica

Prof. Dr. José Realino de Paula

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica

Profa. Dra. Carolina Horta Andrade

**Goiânia-GO
2017**

***Dedico este trabalho a meu pai Oldeci
Raimundo de Freitas (in Memoriam)***

O agradecimento fica primeiramente à Deus por me dar a oportunidade, força e conhecimento para alcançar meus objetivos;

Aos meus pais Oldeci Raimundo de Freitas (in Memoriam) e Ilma Pereira Morais Freitas pelo incansável esforço e incentivo para que eu nunca deixe de buscar o conhecimento;

À minha esposa Naiara Raica Lopes de Oliveira que foi e é uma companheira para todas as horas, e esteve ao meu lado nas horas de dificuldades sempre me confortando com amor, carinho e compreensão;

À minha querida irmã Alline Pereira de Freitas e meu sobrinho Talles Gabriel de Freitas França pelo carinho;

Ao Prof. Dr. Eric de Souza Gil pela oportunidade, orientação e pela amizade adquirida neste período;

Ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz pela co-orientação, ensinamentos e sugestões na elaboração do trabalho e também ao seu grupo do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas do Instituto de Química (LACEM-IQ), onde a identificação dos compostos foi realizada;

Ao Prof. Dr. Paulo César Guedini e seu grupo do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (LFBM-ICB), pela parceria nos ensaios farmacológicos;

Aos amigos de laboratório que sempre estão disponíveis para ouvir, sugerir e ajudar, e também pelos agradáveis momentos de descontração, vocês são Lafamtásticos!

À Servidora Fernanda Bellato por sua presteza e atenção;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF);

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF-UFG), que me acolhe como servidor e aluno, e que eu agradeço toda unidade nas pessoas de minhas chefias direta, Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha e ao Farm. MSc. Elviscley de Oliveira Silva, meus sinceros agradecimentos por toda compreensão e ajuda neste período.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Cerveja	1
1.1.1 Histórico	1
1.1.2 Classificação	1
1.1.3 Produção	3
1.2 Compostos Fenólicos na cerveja	5
1.3 Espécies reativas de oxigênio, antioxidantes e capacidade antioxidante	6
1.4 Avaliação da atividade antioxidante	8
1.4.1 DPPH	9
1.4.2 ABTS	10
1.4.3 Folin-Ciocalteu	10
1.4.4 Eletroquímica	10
1.4.4.1 Voltametria	11
1.4.4.2 Sensores Eletroquímicos	15
1.4.4.2.1 Biossensores e sensores biomiméticos	16
1.5 Identificação dos compostos majoritários	18
1.6 Atividade protetora do sistema vascular	19
1.6.1 Estrutura dos vasos sanguíneos e função endotelial	19
2 OBJETIVOS	22
3 MÉTODOS	23
3.1 Reagentes e Padrões	23

3.2 Amostras -----	23
3.2.1 Cervejas -----	23
3.2.2 Lúpulos e maltes -----	23
3.3 Animais -----	24
3.4 Ensaios espectrofotométricos -----	24
3.4.1 Amargor, cor e teor de álcool -----	24
3.4.2 DPPH -----	25
3.4.3 ABTS -----	25
3.4.4 Folin-Ciocalteu -----	26
3.4.5 Determinação da atividade de inibição da peroxidação lipídica -----	26
3.5 Ensaios eletroquímicos -----	26
3.5.1 Índice Eletroquímico -----	27
3.5.2 Sensor de adenina -----	27
3.6 Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa LC-Q-TOF	27
3.7 Reatividade Vascular -----	28
3.8 Análises estatísticas -----	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	30
6 CONCLUSÕES -----	69
REFERÊNCIAS -----	70
ANEXOS -----	85
APÊNDICES -----	87

Quadros

Quadro 1.	Principais diferenças entre os tipos de fermentação, <i>ale</i> e <i>lager</i> .	2
------------------	--	---

Figuras

Figura 1.	Esquema do processo de fabricação de cervejas. Adaptado de http://www.dortmund.com.br/	4
Figura 2.	Estrutura química dos principais tipos de flavonóides.	8
Figura 3.	Reação de estabilização de Radical DPPH por ação de antioxidante (AH).	9
Figura 4.	Reação de formação e estabilização de radical ABTS por ação de antioxidante.	10
Figura 5.	Potencial versus tempo, mostrando varredura triangular na voltametria cíclica	12
Figura 6.	Curva potencial vs. Corrente.	13
Figura 7.	A) esquema de aplicação dos pulsos em DPV; b) gradiente de corrente (Δi) em função do potencial (E).	14
Figura 8.	a) Potencial aplicado no eletrodo de trabalho em SWV e b) Voltamograma de Onda Quadrada (E vs I) indicando a corrente total (ΔI), anódica ou de oxidação $I(1)$ e catódica ou de redução $I(2)$. Fonte: BRETT e OLIVEIRA-BRETT, 1993.	15
Figura 9.	Componentes de um biossensor. A detecção do analito alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C). CALIL, 2011.	17
Figura 10.	Estrutura do vaso mostrando as diferentes camadas: A) Adventícia; B) Túnica média; C)). Fonte: Adaptada de Servier Medical Art – Powerpoint Image Bank.	19

Figura 11.	Representação esquemática do banho de órgãos utilizado para o estudo da reatividade vascular.	29
-------------------	---	----

Anexos

Anexo 1	Normas para publicação artigo 1	86
Anexo 2	Normas para publicação artigo 2	87

Apêndices

Apêndice 1	Certificado de apresentação na forma oral no <i>I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica – PPGIF</i> .	87
Apêndice 2	Certificado de apresentação na forma oral no <i>XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica</i> .	88
Apêndice 3	Certificado de apresentação na forma de pôster <i>67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry</i> .	89
Apêndice 4	Artigo: Electroanalysis for Quality Control of Acerola (<i>Malpighia emarginata</i>) Fruits and their Commercial Products.	90
Apêndice 5	Artigo: Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples.	91
Apêndice 6	Artigo: Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts.	92

ARTIGO 1

Tabelas

Table 1.	Identification and physicochemical properties of commercial beers analyzed in this study.	35
Table 2.	Electrochemical index and spectrophotometric assays, DPPH, ABTS and TPC, to determine antioxidant activity of beer samples (n=3).	43
Table 3.	Compounds identified in beer samples.	45

Figuras

Fig. 1.	Voltammetric characterization and redox profile for LB10 sample obtained in 0.1 M phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode; (A)- First (—) and second scans (— — —) of cyclic voltammograms. Scan rate of 100 mV s ⁻¹ . (B)- SW voltammograms. Pulse amplitude of 50 mV, frequency of 22 Hz, effective scan rate of 90 mV s ⁻¹ . (C)- First (—) and second (- - -) successive DPV scans.	41
Fig. 2.	(A) 3 D plots of DP voltammograms baseline corrected for beer sample (LB) in different pH solutions. (B) <i>E</i> _{pa} vs pH plot. Pulse width of 5 mV, pulse amplitude of 50 mV, scan rate of 10 mV.s ⁻¹ .	42
Fig. 3.	The PCA biplot. Showing the three groups (I, II and III).	45
Supplementary Fig. S1.	Mass spectrums of identified compounds (A) caffeic acid (B) catechin (C) trihydroxyoctadecenoic acid (D) isoxanthohumol (E) cohumulone (F) humulone.	46
Fig. 4.	Representative cumulative concentration-response curves tracing of LB10, AB1 and AB6 beer samples on aortic rings with- (A) or without- (B) endothelium pre-contracted with phenylephrine (1μM). Values are expressed as means ± SEM (n= 5–7 per sample). * <i>P</i> < 0.05 compared to the vehicle-treated group (ANOVA, Tukey post hoc test).	48
Supplementary Fig. S2.	Representative cumulative concentration-response curves of LB10 (A), AB1 (B) and AB6 (C) beer samples on pre-contracted aortic rings in the presence of Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Values are expressed as means ± SEM (n= 5–7 per sample). * <i>P</i> < 0.05 compared	49

to the vehicle-treated group (ANOVA, Tukey post hoc test).

Fig. 5.	(A) Malondialdehyde (MDA) levels from lipid peroxidation in rat brains; (B) DPV voltammograms obtained for CPE-Ade. Blank signal (—); after Immersion in hydrogen peroxide (– – –); Immersion in LB10 in the presence of hydrogen peroxide (....).	51
----------------	--	----

ARTIGO 2

Tabelas

Table 1.	Identification of hops and malt samples analyzed in this study.	59
Table 2.	Electrochemical index and spectrophotometric assays, DPPH, ABTS and TPC, to determine antioxidant activity of hops and malt samples (n = 3).	66

Figuras

Fig. 1.	Differential pulse voltammograms obtained in 0.1 mol L ⁻¹ Phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode; A) for hops sample extract 1% (w,v) and B) for malted barley extract 40% (w,v).	62
Fig. 2.	A) First (—), second (---) and third (···) successive CV scans for HCO sample. Scan rate of 100 mV s ⁻¹ . B) First (—), second (---) and third (···) successive DPV scans for HCO sample. Pulse amplitude of 50 mV, pulse width of 5 mV, scan rate of 10 mV s ⁻¹ . Obtained in 0.1 mol L ⁻¹ phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode.	63
Fig. 3.	A) 3D plots of differential pulse voltammograms baseline corrected for Columbus hop sample in different pH conditions. B) E _{pa} vs pH plot. Pulse	64

amplitude of 50 mV, pulse width of 5 mV, scan rate of 10 mV s⁻¹.

Fig. 4.

SW voltammograms for HCO hop sample obtained in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode. Pulse amplitude of 50 mV, frequency of 22 Hz, effective scan rate of 90 mV s⁻¹.

65

[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
AA	Antioxidant activity
AB	Ale Beer
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Ach	Acetilcolina
MLC	Cadeia leve de miosina
CPE-Ade	Eletrodo de Pasta de Carbono e Adenina
CV	Voltametria cíclica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1- difenil-1-picril-hidrazil
DPV	Voltametria de pulso diferencial
EBC	European Brewery Convention
EGM	Eletrodo gotejante de mercúrio
<i>E</i> _{pa}	Potencial anódico
<i>E</i> _{pc}	Potencial catódico
ESI	Eletronspray
FC	Folin-Ciocalteu
FT	Fenóis totais
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GCs	Guanilato ciclase solúvel

GMPc	3',5' guanosina monofosfato cíclico
HBH	Hops Barth-Hass
HCA	Hops Cascade
HCO	Hops Columbus
HHA	Hops Harllateau
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBU	International Bitterness Unit
IE	Índice Eletroquímico
IP3	Trifosfato de inositol
<i>I</i> _{pa}	Corrente de pico anódico
<i>I</i> _{pc}	Corrente de pico catódico
LB	Lager Beer
LC	Liquid Chromatrography
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MCC	Malt Chateau Cristal
MCM	Malt Chateau Munich
MP	Malt Pilsen
MW	Malt Wheat
NO	Óxido nítrico
PDA	Photodiode Array
Phe	Phenylephrine
PKG	proteína quinase G

QTOF	Analizador híbrido Quadrupole-Time of Flight
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEM	Standard Reference Method
SWV	Voltametria de onda quadrada
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TPC	Total Phenols Content
UV/VIS	Ultravioleta/visível

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais antigas e populares consumidas pela humanidade, a principal classificação das cervejas é quanto ao tipo de fermentação, dividindo-se em *ale* ou *lager*, alta e baixa fermentação, respectivamente. Neste estudo, as amostras de cerveja foram divididas em duas porções, a primeira para os ensaios espectrofotométricos e eletroquímicos, a qual foi utilizada de forma *in natura*. E a segunda parte foi liofilizada, para padronização da concentração de uso, retirada do álcool e garantir uma maior durabilidade, e então utilizada nos ensaios farmacológicos e cromatográficos. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial antioxidante, a atividade vasodilatadora e correlacionar com os perfis fenólicos de vinte e duas cervejas comerciais. Adicionalmente foi também verificada a capacidade antioxidante e o perfil fenólico de lúpulos e maltes de diferentes origens. Das matérias-primas, as amostras de lúpulo mostraram uma melhor atividade antioxidante quando comparadas com as amostras de malte ($p < 0,05$). A correlação entre o índice eletroquímico (IE) com os fenóis totais (TPC), e os ensaios de captura de radicais, 1,1- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi de 0,86, 0,77 e 0,85 respectivamente para as amostras de lúpulo. Enquanto que para as amostras de malte foi 0,49, 0,69 e 0,96, respectivamente. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar diferenças dentro de cada grupo de matéria-prima, sendo observadas diferenças a nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Das cervejas, o grupo *ale* mostrou melhores capacidade antioxidante e valores de fenóis totais quando comparado com o grupo *lager*. Porém, de acordo com a matriz de correlação de Pearson, a correlação entre o IE com TPC, DPPH e ABTS foi de 0,78, 0,82 e 0,89 respectivamente para o grupo *lager*. Enquanto que para o grupo *ale* as correlações não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), principalmente devido à interferência da turbidez das amostras durante ensaios espectrofotométricos. Este fato reitera o uso de métodos eletroquímicos, que minimizam este tipo de problema além de serem mais sensíveis e rápidos. Seguindo a metodologia eletroquímica proposta, através do cálculo do IE, as amostras LB10 e AB1 obtiveram os maiores índices. Nos resultados da análise de componentes principais foram observados três grupos, onde o grupo III confirma LB10 e AB1 como as de melhores potenciais antioxidantes. LB10, AB1 e AB6 mostraram efeito vasodilatador máximo de 92 ± 4 , 88 ± 3 e $79 \pm 3\%$, respectivamente. Tanto o efeito vasodilatador quanto a capacidade de inibição da peroxidação lipídica, podem estar associados à presença de compostos fenólicos nas cervejas, identificados via espectrometria de massa. Este estudo, portanto, verificou que a metodologia proposta do IE é uma importante ferramenta para avaliar as propriedades antioxidantes e mostrou uma boa correlação com ensaios de eliminação de radicais. Além disso, o estudo mostrou que as cervejas podem ter um efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, apresentando boa correlação do efeito vasodilatador e o potencial antioxidante, o que pode ser útil para pesquisas futuras sobre a saúde, propriedades sensoriais e parâmetros de qualidade. Ainda sobre o ponto de vista da qualidade das cervejas, os extratos de lúpulo, assim como de malte, apresentaram resultados estatisticamente diferentes entre si, corroborando para aplicabilidade destas ferramentas na escolha destes ingredientes majoritários em prol da qualidade do produto final.

Palavras chaves: cerveja, potencial antioxidante, vasodilatação, compostos fenólicos, lúpulo, malte.

ABSTRACT

Beer is one of the oldest and most popular beverages consumed by mankind, the main classification of beers is the type of fermentation, divided into ale or lager, high and low fermentation, respectively. In this study, beer samples were divided into two portions, the first one for the spectrophotometric and electrochemical tests, which was used in natura form. And the second part was lyophilized, aiming at the concentration use standardization, alcohol withdrawal and guaranteeing an increase of durability, and then used in the pharmacological and chromatographic tests. The aim of this study was to investigate the antioxidant potential and vasodilator activity and correlate them with the phenolic profiles of twenty-two commercial beers. In addition, the antioxidant activity and the phenolic profile of hops and malts from different origins were also verified. From the raw materials, hops samples showed better antioxidant activity when compared to malt samples ($p < 0.05$). The correlation between electrochemical index (EI) and total phenols (TPC), and radical scavenging methods, 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline -6-sulphonic acid) (ABTS) was 0.86, 0.77 and 0.85 respectively for the hop samples. From the beers, ale group showed better antioxidant activity and TPC values when compared to the lager group. However, according to the Pearson correlation matrix, the correlation between IE with TPC, DPPH and ABTS was 0.86, 0.89 and 0.96 respectively for the lager group. While for the ale group, the correlations were not statistically significant ($p > 0.05$), mainly due to the turbidity interference of the samples during spectrophotometric assays. This fact reiterates the use of electrochemical methods, which minimize this type of problem besides being more sensitive and quick. Following the proposed electrochemical methodology, using the IE calculation, LB10 and AB1 samples obtained the highest indices. In the results of the principal components analysis (PCA) three groups were observed, where group III confirms LB10 and AB1 as the best antioxidants potential. LB10, AB1 and AB6 showed a maximal vasodilator effect of 92 ± 4 , 88 ± 3 and $79 \pm 3\%$, respectively. Both the vasodilator effect and the lipid peroxidation inhibition capacity may be associated with the presence of phenolic compounds in the beer samples, identified by mass spectrometry. This study, therefore, verified that the proposed IE methodology is an important tool to evaluate antioxidant properties and showed a good correlation with radical scavenging assays. Moreover, the study showed that beers may have a beneficial effect on the cardiovascular system, showing a good correlation of the vasodilator effect and antioxidant potential, which may be useful for future research on health, sensorial properties and quality parameters. Still from the standpoint of the quality of the beers, hop extracts as well as malt exhibited statistically results, corroborating to the applicability of these tools in the choice of these major ingredients improve the quality of the final product.

Keywords: beer, antioxidant potential, vasodilation, phenolic compounds, hops, malt.

1.1. Cerveja

1.1.1 Histórico

A palavra cerveja vem do latim *cervesia*, que significa bebida fermentada e da palavra *bibere* que também provém do latim e quer dizer beber em outros idiomas, como inglês e alemão, denominada *beer* e *bier*, respectivamente (KUNZE, 1997).

A cerveja é uma das mais antigas produções culturais da humanidade e uma das bebidas mais populares em todo o mundo (WUNDERLICH e BACK, 2009). Não se sabe ao certo a origem das primeiras cervejas. Porém, acredita-se que tenha originado na região da Mesopotâmia, onde há evidências e inscrições em ruínas que levam a crer que a cerveja feita de cevada maltada já era consumida em 6.000 a.C.. Também na China há registros de 4000 anos a.C. da *kiu*, cerveja feita à base de cevada, trigo, milho e arroz (KUNZE, 1997). No Egito, também considerado um dos berços da cerveja, esta bebida tinha grande importância, pois era oferecida a Deuses e estava presente nos tesouros dos sarcófagos mais notáveis. Na América, acredita-se que a cerveja chegou por meio de imigrantes, colonos primitivos holandeses e ingleses, que trouxeram a tecnologia doméstica da fabricação da cerveja (FREITAS, 2006; PAVSLER & BUIATTI, 2009).

No Brasil a chegada da cerveja ocorreu no início do século XIX, trazida pela família real portuguesa no então Brasil colônia. Em 1836, tem-se a primeira notícia sobre a fabricação de cerveja no Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2008). No início do século XX a indústria cervejeira já estava estabelecida, com 27 cervejarias registradas (FREITAS, 2006).

1.1.2 Classificação

As cervejas podem ser classificadas de cinco maneiras diferentes. A primeira delas é segundo a quantidade em peso de extrato presente no mosto antes da fermentação, o chamado extrato primitivo, tem-se então que ela pode ser leve (5-10,5%), comum (10,5-12%), extra (12-14%) e forte (>14%). Outra classificação é de acordo com a cor, sendo clara a que tiver cor correspondente menor que 20 unidades EBC (*European Brewery Convention*), escura aquela que tiver mais de 20 unidades EBC e colorida, a que, pela ação de corantes naturais, apresenta coloração diferente

das definidas pelo padrão EBC. São classificadas também quanto ao teor alcoólico: elas podem ser denominadas cervejas sem álcool, as que têm teor menor que 0,5%, e cervejas com álcool, as que contêm mais de 0,5%, sendo que esta última ainda se subclassifica em teor alcoólico baixo (0,5-2,0%), médio (2,0-4,5%) e alto (4,5-7,0%). A proporção de malte de cevada, como fonte de açúcares, também é uma forma de se classificar as cervejas, onde elas são divididas em puro malte (100% de malte de cevada), cerveja (>50% de malte de cevada) e cerveja com o nome do cereal principal (20-50% de malte de cevada). A última classificação é uma das principais é quanto à fermentação, sendo denominadas *ale*, aquelas de fermentação superficial, e *lager*, aquelas de fermentação profunda (BRASIL, 2009; CERVESIA; SINDCERV, 2016).

As cervejas do tipo *lager*, que são elaboradas com cepas de *Saccharomyces calshbergensis*, são fermentadas a temperaturas de 3,3 a 13,0 °C e o tempo de fermentação varia de 4 a 12 semanas. As do tipo *ale*, elaboradas com cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, são tipicamente fermentadas a uma temperatura entre 16 °C e 24 °C, Quadro 1. A estas temperaturas, a levedura produz quantidades significativas de ésteres e outros sabores e aromas de produtos secundários, e o resultado é muitas vezes uma cerveja ligeiramente com compostos "frutados", tendo uma característica mais adocicada e encorpada em comparação a *lager* (ARAÚJO *et al.*, 2003; PAVSLER e BUIATTI, 2009).

Quadro 1. Principais diferenças entre os tipos de fermentação, *Ale* e *Lager*.

Características/Tipos de fermentação	<i>Ale</i>	<i>Lager</i>
Origem:	Antiga	Relativamente nova
Temperatura de fermentação (°C):	16,0 a 24,0	3,3 a 13,0
Levedura:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces calshbergensis</i>
Posição da levedura no tanque de fermentação:	Alto do tanque	Baixo do tanque
Produto final:	Forte, assertivo e mais robusto no paladar	Mais suave, mais nítidas e com sabor e aroma mais sutil

As cervejas do tipo *lager* são mais populares mundialmente do que as do tipo *ale*. Apesar de representarem uma pequena porcentagem do consumo total de cerveja em âmbito mundial, as cervejas do tipo *ale* são predominantes em países como Alemanha, Bélgica, Canadá, Estados Unidos e Grã-Bretanha. Como exemplos de cerveja tipo *lager* se pode citar a *Bock*, *Dortmunder*, *Munchner* e *Pilsener* e de cerveja tipo *ale* tem-se a *Porter*, *Stout*, *Alt*, *Light ale*, *Pale ale* e *Barley wines* (ARAÚJO *et al.*, 2003; PAVSLER & BUIATTI, 2009; CERVESIA; SINDCERV, 2016).

1.1.3 Produção

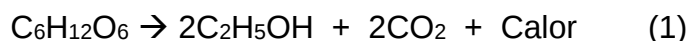
Cervejarias em todo o mundo produzem cerveja utilizando matérias-primas essenciais como água, malte, levedura e lúpulo. Como foi fixado pela Lei da Pureza alemã, dita *Reinheitsgebot*, que rege, juntamente com leis mais recentes, a fabricação de cerveja comercial desde o século 14 (BGB1, 1993). Tecnologias de fabricação de cerveja são embasadas nesta lei, embora cervejeiros em outros países tenham mais flexibilidade, como por exemplo, a seleção da fonte de amido, que pode depender do tipo, da tradição ou da preferência local (FREITAS, 2006).

A legislação brasileira define cerveja e sua composição, e a lei preconiza que cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Ainda de acordo com a lei se aceita algumas substituições, tais como, o malte de cevada e o lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos e parte do malte de cevada poderá ser substituída por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não. Os cereais referidos na legislação são: cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo (BRASIL, 1997).

No processo de fabricação de cerveja, primeiramente o malte, obtido pela germinação e secagem da cevada, é moído e então misturado com água quente, em temperaturas pré-estabelecidas. Há então o início da ação enzimática, responsável por fragmentar as cadeias de amido em açúcares fermentáveis, tais como frutose, glicose e maltose. Esta mistura é filtrada e o líquido resultante é denominado mosto. O mosto é levado à ebulição com finalidade de esterilização deste e também para coagular as proteínas presentes. Durante este processo, seja no início, meio ou fim da fervura, o lúpulo é adicionado, com o objetivo de conferir amargor e aroma característico da cerveja; além disso, o lúpulo auxilia na conservação e estabilidade de espuma das cervejas. Posteriormente há a decantação, refrigeração e aeração

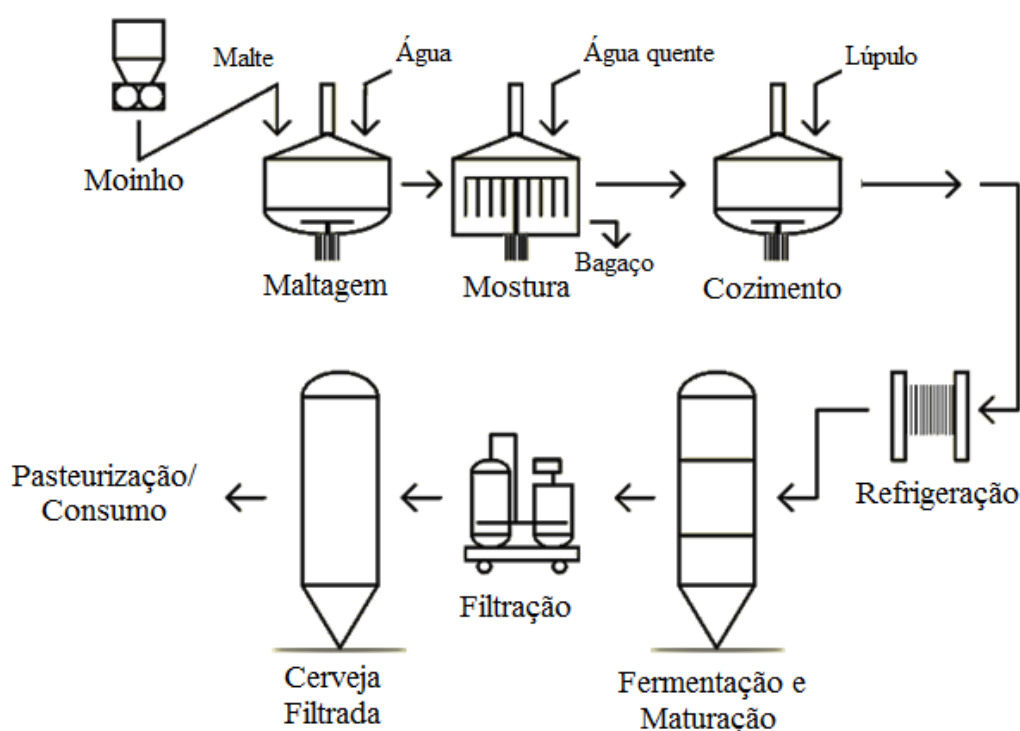
do mosto e, este está pronto para a etapa de fermentação (WUNDERLICH & BACK, 2009; PALMER, 2015; CERVESIA; SINDCERV, 2016).

Na etapa de fermentação, os açúcares presentes no mosto são consumidos pela levedura adicionada, e são transformados em álcool, gás carbônico e calor (equação 1). A levedura, a temperatura e o tempo de fermentação são dependentes do tipo de cerveja que se quer produzir, *ale* ou *lager*, como já descrito anteriormente (WUNDERLICH & BACK, 2009; CERVESIA; SINDCERV, 2016).



Uma vez concluída a fermentação, o mosto “descansa” a temperaturas próximas de zero, para aprimoramento do aroma e do sabor, etapa denominada de maturação. A maturação pode levar alguns dias ou até semanas, dependendo do protocolo de cada cervejaria. Nesta fase, a maior parte do fermento é separada por decantação e, por conseguinte se efetua uma filtração, que objetiva eliminar partículas em suspensão. Ao final desta etapa, a cerveja está praticamente concluída, com sabor e aroma finais definidos, sendo submetida ao envase e pasteurização e, estando pronta para o consumo, figura 1 (WUNDERLICH & BACK, 2009; PALMER, 2015; CERVESIA; SINDCERV, 2016).

Figura 1. Esquema do processo de fabricação de cervejas. Adaptado de <http://www.dortmund.com.br/>



1.2. Compostos Fenólicos na cerveja

Os compostos fenólicos são resultantes do metabolismo secundário das plantas, encontrados principalmente em frutas, verduras, legumes, cereais e bebidas, como sucos de frutas, vinho, chá, café e cerveja (WEINREB *et al.*, 2004; ROGINSKY e LISSI, 2005). Podem ser encontrados em sua forma livre ou, mais frequentemente, ligados a outros compostos, como ésteres e glicosídeos (CORREIA, 2005).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor e cor (RICE-EVANS *et al.*, 1997), auxiliam no combate a patógenos, em situações de stress e na proteção contra agressões externas (ARRIBAS *et al.*, 2012). Atualmente, o interesse neste tipo de compostos tem aumentado devido às suas propriedades farmacoterapêuticas, como atividades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatórias e antitumorais (GERHAUSER, 2005; VAQUERO *et al.*, 2007; ESTEVINHO *et al.*, 2008; De MARTINO *et al.*, 2009).

Os principais compostos fenólicos presentes na cerveja provem essencialmente da casca de cevada malteada (70-80%) e do lúpulo (20-30%) (KEUKELEIRE, 2000). Dentre eles podem-se destacar os ácidos hidrobenzóicos (ácido gálico), os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido caféico), os flavonóis (quercetina), as chalconas (xantohumol) e as flavanonas (prenilnaringenina). Também podem estar presentes compostos mais complexos, como catequinas e taninos (HEIM *et al.*, 2002; GARCÍA *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos são excelentes doadores de elétrons, atuando como antioxidantes pela captura de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (SOUSA *et al.*, 2007), e, tem importante papel nas características sensoriais (cor, aroma e sabor), estabilidade oxidativa e segurança microbiológica da cerveja (JANDERA, 2009). Quando compostos fenólicos se oxidam, podem sofrer polimerização, e tais compostos, na presença de polipeptídios, formam substâncias insolúveis que resulta no aumento da turbidez da cerveja (BAMFORTH, 2000; BOTELHO, 2009).

Em face da diversa e rica constituição das cervejas, o interesse pelo estudo de suas propriedades nutritivas e nutracêuticas, em especial com potencial para a prevenção de numerosas doenças, têm crescido e atraído um interesse considerável de vários pesquisadores (GERHAUSER, 2005; ONÑATE-JAÉN *et al.*, 2006; FEGREDO *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos presentes na cerveja são os

responsáveis, assim como no vinho, por potencializar a proteção contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, descartando os aspectos negativos produzidos por altas doses de etanol (GHISELLI *et al.*, 2000; DUTTHIE *et al.*, 2000; BOBAK *et al.*, 2000; GERHAUSER, 2005). Esta alta concentração de compostos com perfil antioxidante faz com que o consumo moderado de cerveja seja capaz de melhorar a atividade antioxidante e capacidade anticoagulante do plasma (GHISELLI *et al.*, 2000; GASOWSKI *et al.*, 2004), de inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) *in vitro* (MIRANDA *et al.*, 2000) e de proteger a peroxidação lipídica (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

O consumo moderado equivale a no máximo 500 mL/dia para homens e 250 mL/dia para mulheres (FREITAS, 2006). O consumo da cerveja em pequenas doses ainda pode fornecer ao plasma proteção significativa contra o estresse oxidativo, redução do risco de infarto do miocárdio em pacientes hipertensos, redução da coagulação sanguínea e aumento do colesterol de lipoproteínas de alta densidade, o HDL (BOBAK *et al.*, 2000). E as substâncias amargas presentes nas cervejas, derivadas do lúpulo, podem evitar aterosclerose, obesidade e diabetes tipo 2 (KLATSKY, 2007).

Ressalta-se ainda que em bebidas como a cerveja, o poder antioxidante se deve predominantemente à presença de compostos fenólicos (GHISELLI *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2010), que são importantes na dieta e possuem propriedades farmacológicas comprovadas (LAPÍCK *et al.*, 1998; ARRANZ *et al.*, 2012).

1.3. Espécies reativas de oxigênio, antioxidantes e capacidade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}^{\cdot}$), têm elevada importância nas reações fisiológicas que ocorrem no organismo humano. Desempenham diversos papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, a produção em excesso destas espécies, seja por condições de estresse, tais como o consumo de drogas, a ação de radiação ultravioleta ou por disfunções metabólicas, pode acarretar em doenças, danos profundos em tecidos, peroxidação de lipídios e agressão às proteínas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (MOLYNEUX, 2004; HUANG *et al.*, 2005). O excesso de ROS está diretamente relacionado com doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, as cardiovasculares, as neurológicas e o câncer (ATOUI *et al.*, 2005; RATHEE *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2010).

Os danos causados pelos radicais livres podem ser prevenidos por meio de três estratégias dietéticas: (1) a restrição calórica; (2) minimização da ingestão de gorduras polinsaturadas e (3) ingestão suplementar de antioxidantes. Esta última se faz necessária, desde que aqueles antioxidantes de origem endógenas não sejam suficientes para controlar os radicais livres. Alguns exemplos de antioxidantes endógenos são: ácido úrico, albumina, e enzimas do tipo superóxido dismutase, catalase e peroxidase (ATOUI *et al.*, 2005).

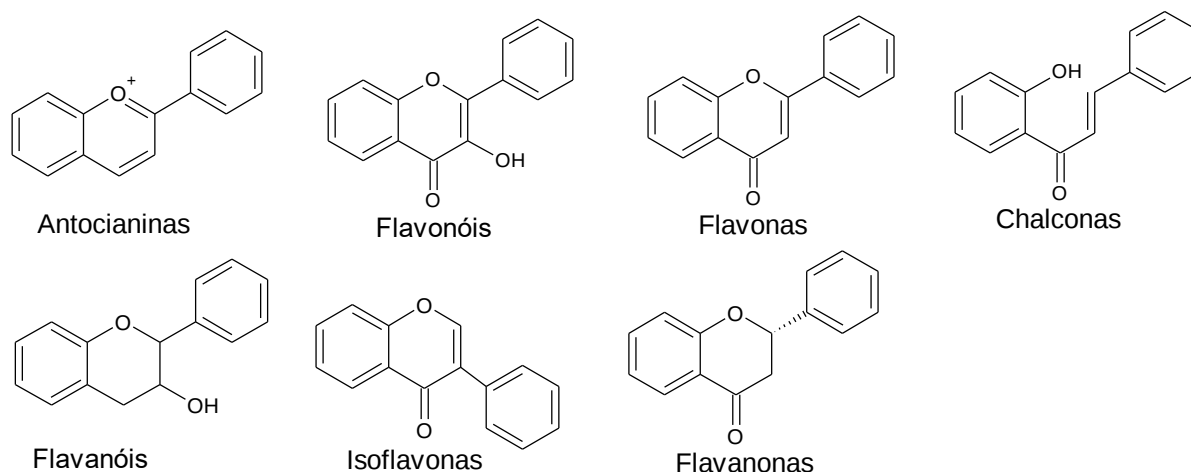
Antioxidantes podem ser definidos como compostos, sintéticos ou naturais, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que têm propriedades de prevenir reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade de oxidação de um dado substrato oxidável (PIETTA, 2000; MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2003).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários são responsáveis pela inativação dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ou elétrons, transformando assim estes radicais em substâncias estáveis. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, aminoácidos e carotenóides (WEIBURGER, 2001; STEINBERG *et al.*, 2003). Já os antioxidantes ditos secundários atuam através de mecanismos de complexação de íons metálicos e agem também bloqueando a decomposição de peróxidos e hidroperóxidos, impedindo assim a reação em cadeia. Entre eles estão os antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), o ácido ascórbico e os tocoferóis (ATOUI *et al.*, 2005).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI *et al.*, 2005). Muitos estudos vêm demonstrando as propriedades benéficas dos antioxidantes, sendo estes utilizados tanto na prevenção de doenças como também nos tratamentos. E cada vez mais são indicados para o controle de danos oxidativos de células (MILNER, 2001).

A estrutura química dos compostos fenólicos é o que determina sua capacidade de atuar como captadores/sequestradores de radicais livre. O número e posição de grupos hidroxilas, o efeito de conjugação entre os anéis e a glicosilação são alguns dos parâmetros que determinam a ação antioxidante destes compostos (RICE-EVANS *et al.*, 1996; HEIM *et al.*, 2002; CORREIA, 2005). Neste sentido, os flavonóides, devido à sua estrutura, figura 2, são ótimos sequestradores de radicais, logo apresentam uma boa capacidade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Figura 2. Estrutura química dos principais tipos de flavonóides.



A ação como antioxidante de muitos produtos naturais começou a atrair a atenção da comunidade científica a partir de 1990, quando foi amplamente reconhecido que uma elevada capacidade antioxidante estava diretamente associada com as influências benéficas de muitos alimentos e bebidas (ROGINSKY & LISSI, 2005).

Nos dias de hoje, a atividade antioxidante de muitos produtos naturais é considerada como um parâmetro importante para determinar o seu valor alimentar. Compostos fenólicos são os principais componentes de alimentos com potencial antioxidante, como já supracitado.

1.4. Avaliação da capacidade antioxidante

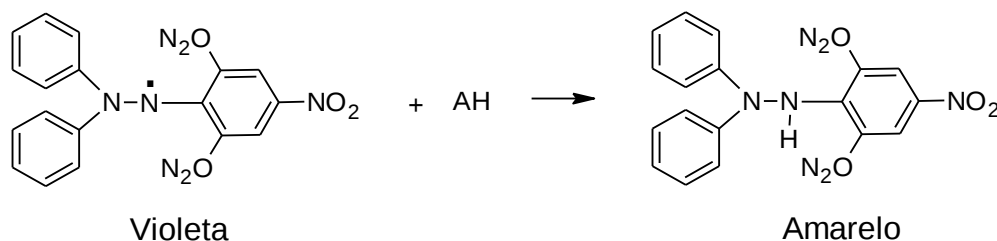
Vários métodos têm sido usados e desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de extratos e substâncias isoladas, dentre os quais podemos destacar os métodos espectrofotométricos tradicionais, como ensaios com o radical 1,1-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), ambos baseados na habilidade de eliminação de radicais livres. Ainda dentre os espectrofotométricos, o ensaio *Folin-Ciocalteu* (FC) é bastante difundido para a determinação de fenóis totais (FT). E mais recentemente os métodos eletroquímicos têm sido utilizados como importantes ferramentas para determinar o perfil oxiredutor de extratos e substâncias isoladas, podendo assim correlacionar com a capacidade antioxidante, nestes métodos o destaque é da voltametria (COSIO *et al.*, 2006; ONÑATE-JAÉN *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2009).

1.4.1 DPPH

O DPPH possui um elétron desemparelhado que está deslocalizado por toda a molécula, lhe conferindo assim o status de radical livre estável. Este elétron deslocalizado é responsável pelo máximo de absorção em torno de 520 nm que confere coloração violeta a esta molécula (MOLYNEUX, 2004). Por ação de um antioxidante (AH), o radical DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, figura 3, reduzindo assim a absorção no comprimento de onda monitorado (BRAND- WILLIAMS *et al.*, 1995). O resultado é dado em IC₅₀, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua capacidade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Apesar da versatilidade do método como rapidez, facilidade de preparo e disponibilidade comercial, este ensaio apresenta algumas limitações analíticas, como a incapacidade de determinar a contribuição antioxidante de espécies hidrofílicas presentes na amostra. Portanto, há uma subestimação da capacidade antioxidante total (ARNAO, 2000; MOLYNEUX, 2004; ALAM *et al.*, 2012).

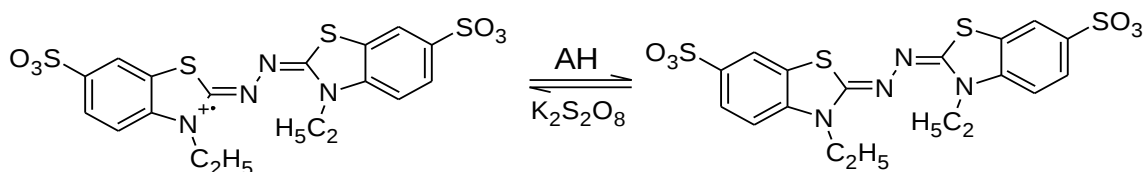
Figura 3. Reação de estabilização de radical DPPH por ação de antioxidante (AH).



1.4.2 ABTS

O método ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar radical ABTS^{•+}, gerado através da reação com persulfato de potássio, figura 4. Esta captura provoca um decréscimo na absorbância, que pode ser lida em 645, 734 ou 815 nm, levando a cor do meio reacional de azul-esverdeada à incolor. O método é aplicável para estudos de antioxidantes hidro e lipossolúveis, tanto em substâncias isoladas como em extratos vegetais. O resultado é dado em IC₅₀, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do radical ABTS em 50%. Quanto maior a quantidade utilizada da amostra em reduzir o radical, menor será a sua capacidade antioxidante (RUFINO *et al.*, 2007; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Figura 4. Reação de formação e estabilização de radical ABTS por ação de antioxidante.



1.4.3 Folin-Ciocalteu

A determinação de fenóis totais (FT) é feita utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu*, o reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfotungstístico e fosfomolibdídico, que na presença de compostos fenólicos formam os chamados, molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração indica a presença de substâncias redutoras. A quantificação espectrofotométrica, em 765 nm, é feita através de curva de calibração com ácido gálico, e o resultado é expresso em concentração do ácido gálico por grama da amostra (SINGLETON *et al.*, 1999; NACZK & SHAHIDI, 2004).

A principal desvantagem deste ensaio é o fato de muitas substâncias presentes em produtos naturais e matrizes complexas absorverem na mesma faixa de comprimento de onda de leitura, além de interferentes que podem reagir com o reagente FC, levando assim a uma superestimação dos resultados para FT (BLASCO *et al.*, 2007; ESCARPA, 2012; SINGLETON *et al.*, 1999).

1.4.4 Métodos Eletroquímicos

Uma grande parte dos fenômenos que ocorrem nos seres vivos corresponde a processos que envolvem transferências de substâncias carregadas. A eletroquímica então se torna uma ferramenta muito importante, visto que estuda os fenômenos químicos associados à separação e transferências de cargas (BRETT & BRETT, 1993).

A separação de cargas pode ocorrer de forma homogênea em solução ou heterogênea na superfície do eletrodo, onde em ambas, há a ocorrência de duas ou mais meias reações de transferências de cargas, em direções opostas, para alcançar a eletroneutralidade (BRETT & BRETT, 1993). Nos processos eletroquímicos, a reação eletroquímica ocorre no eletrodo de trabalho, na interface eletrodo-eletrólito. O potencial deste eletrodo é controlado pelo eletrodo de referência, que deve possuir alta impedância para garantir a não passagem de corrente no mesmo. A corrente de uma célula eletroquímica flui entre os eletrodos de trabalho e auxiliar através da solução eletrolítica (ASSIS, 2012).

Os métodos eletroanalíticos utilizam-se das propriedades elétricas dos analitos, como potencial, corrente, resistência, condutividade ou carga, presentes na amostra de interesse, podendo fornecer dados tanto qualitativos como também quantitativos (BRETT & BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2011). Suas vantagens se baseiam em uma boa seletividade, alta sensibilidade, simplicidade e rapidez nas análises, além de um baixo consumo de amostras e reagentes, que, vai de encontro com a preocupação cada vez maior com a diminuição da geração de resíduo e posterior impacto ao meio ambiente. (GONÇALVES *et al.*, 2011; BLASCO *et al.*, 2004). Dentre as diversas técnicas eletroquímicas, destaca-se a grande aplicabilidade das voltamétricas (SKOOG *et al.*, 2006).

1.4.4.1 Voltametria

Em 1920, o cientista tchecoslovaquio, Jaroslav Heyrovsky, desenvolveu a polarografia, um tipo de voltametria, onde o eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) é usado como eletrodo de trabalho. Mais tarde, em 1959, Jaroslav ganhou o Nobel de Química por esta descoberta. Desde então, a voltametria se tornou uma ferramenta popular amplamente utilizada para estudos de processos de oxidação e redução, de adsorção e transferência de elétrons na superfície de eletrodos modificados ou não (SKOOG *et al.*, 2006), de modelos de catálises enzimáticas (YE-MEI *et al.*, 2004), na conversão de energia solar (ANGULO *et al.*, 2009), no controle de qualidade industrial (LENCASTRE *et al.*, 2006), no monitoramento ambiental (MACCHI, 1965) e na determinação de atividade antioxidante (LINO *et al.*, 2014; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2016).

A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia em fenômenos que ocorrem na região situada entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina formada pela solução. Esta técnica é dita dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. Assim, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medida da magnitude da corrente elétrica que surge entre os eletrodos de trabalho e auxiliar, ao se aplicar uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência (PACHECO *et al.*, 2013).

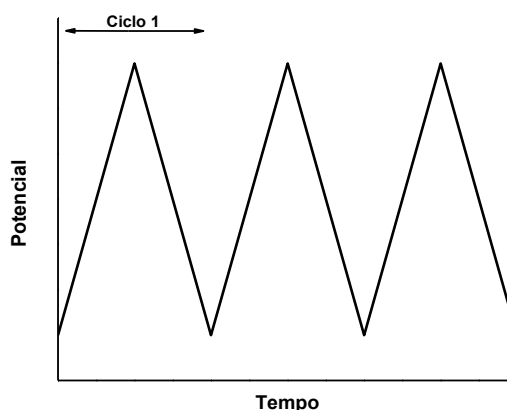
As técnicas voltamétricas tem recebido um interesse especial no sentido de determinar a atividade antioxidante, visto que elas conseguem correlacionar esta atividade com os potenciais de oxidação e as intensidades de corrente, sendo os

compostos considerados melhores antioxidantes aqueles cuja oxidação ocorre em potenciais menores, ou seja, que se oxidam com maior facilidade (MANNINO *et al.*, 1998; ARRIBAS *et al.*, 2012). Logo, se a matriz apresenta compostos eletroativos, haverá transferências de elétrons, portanto poderá ser mensurado. Ademais, tais técnicas trazem como vantagens a sensibilidade, rapidez, a pouca instrumentação, o não tratamento de amostras e a utilização de pequenos volumes de amostras, se mostrando assim melhores que os ensaios espectrofotométricos (BARA *et al.*, 2008; ARTEAGA *et al.*, 2012; LINO *et al.*, 2014; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas voltamétricas mais utilizadas estão: voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. Estas são diferenciadas de acordo com a forma que o potencial é aplicado e como o sinal analítico é adquirido (GARRIDO *et al.*, 2004; SKOOG *et al.*, 2006).

Na voltametria cíclica (do inglês *cyclic voltammetric*, CV) é feita uma varredura de potencial em função do tempo, onde o potencial aumenta e depois diminui linearmente, tendo um comportamento triangular, figura 5.

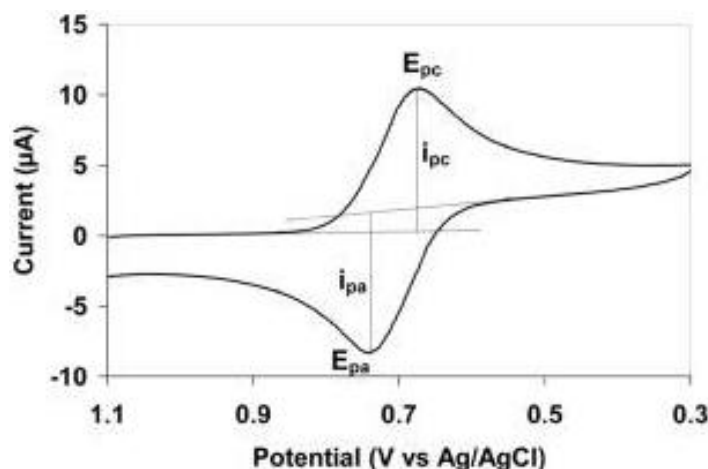
Figura 5. Potencial *versus* tempo, mostrando varredura triangular na voltametria cíclica.



A CV é utilizada principalmente para fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox e verificar a reversibilidade de compostos, visto que esta técnica é capaz de mensurar os seguintes parâmetros: I_{pa} corrente de pico anódico, I_{pc} corrente de pico catódico, E_{pa} potencial anódico e E_{pc} potencial catódico, figura 6. Além disso, é bastante aplicada na detecção de intermediários de reação, na observação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos e na investigação de antioxidantes, onde quanto maior o valor de E_{pa} ,

menor é o poder doador de elétron da espécie em estudo e, portanto, teoricamente, menor seu poder antioxidante (HOTTA *et al.*, 2002; SKOOG *et al.*, 2006).

Figura 6. Curva potencial *versus* corrente.



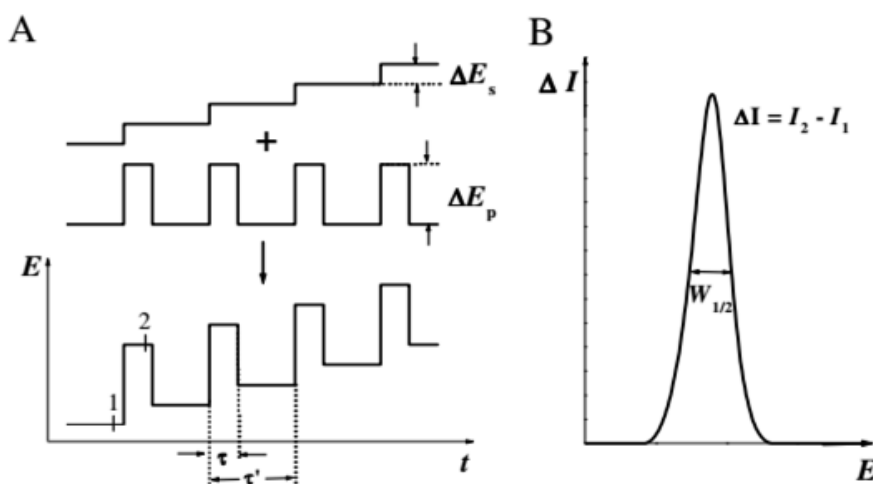
Ainda sobre CV, é uma técnica muito influenciada pela corrente capacitiva, que limita a técnica a concentrações na ordem de 10^{-5} mol/L, ou seja, pouco sensível. Outras limitações da CV são evidentes em matrizes complexas, como bebidas e fluidos biológicos, onde se observa dificuldades do processo em si e da atribuição de potenciais e ainda apresenta baixa resolução em relação à informação estrutural, sendo necessária associação com outras técnicas espectroscópicas (ARTEAGA *et al.*, 2012). Mesmo com as limitações supracitadas, a CV apresenta bons resultados na análise de antioxidantes encontrados no vinho (KILMARTIN *et al.*, 2001; LINO *et al.*, 2014), em extratos de plantas (CAMPANELLA *et al.*, 2006; YAKOVLEVA *et al.*, 2007) e em fluidos biológicos (CHEVION *et al.*, 1997a; CHEVION *et al.*, 1997b).

Na voltametria de pulso diferencial (do inglês *differential pulse voltammetry*, DPV), é feita uma varredura de potencial pelo tempo com pulsos adicionais. Estes pulsos têm valor de potencial e duração pré-determinados, e são aplicados em determinados intervalos de tempo, como pode ser visto na figura 7. Uma característica importante do pulso de potencial aplicado é que o incremento dele deve ser constante (SKOOG *et al.*, 2006).

A DPV se mostra mais sensível em relação a CV, pois é capaz de eliminar grande parte da corrente capacitiva. Essa diminuição ocorre devido a corrente que é medida duas vezes (I_1 e I_2), uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. Portanto, é possível desvincular o valor da corrente capacitiva, aumentando a sensibilidade da técnica (REIS *et al.*, 2009).

A DPV ainda permite identificar se os processos de transferência de prótons e a formação de produtos eletroativos estão ou não acoplados com processos de transferência de elétron (DICULESCU *et al.*, 2012), ademais a DPV confere uma melhor resolução entre os picos de corrente, levando a uma melhor caracterização destes (BRETT & OLIVEIRA-BRETT, 1993; MASEK *et al.*, 2011).

Figura 7. A) esquema de aplicação dos pulsos em DPV; B) gradiente de corrente (ΔI) em função do potencial (E).

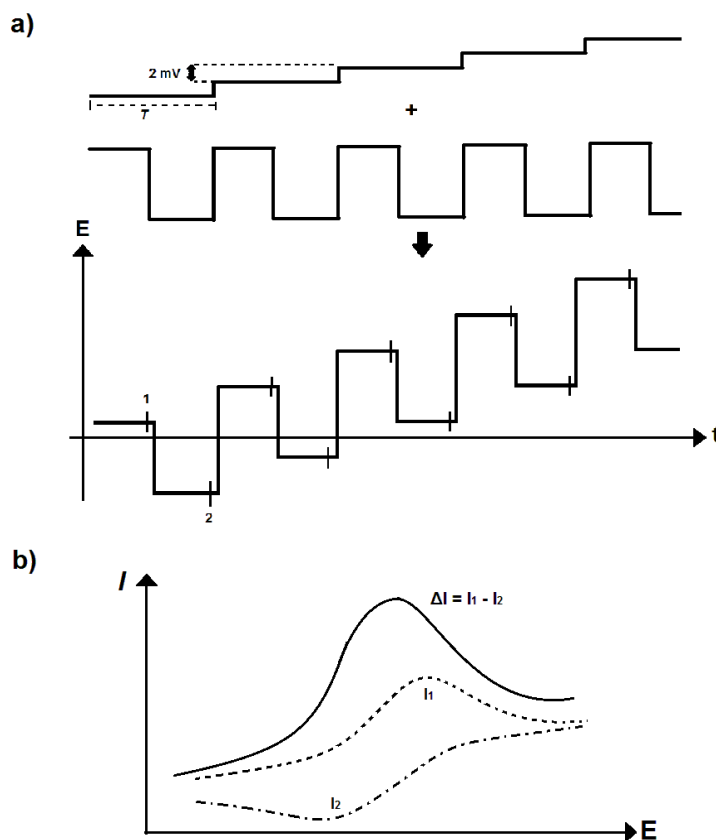


A voltametria de onda quadrada (do inglês *square wave voltammetry*, SWV) é uma técnica onde o potencial é aplicado em forma de pulso, e este pulso é aplicado como onda quadrada simétrica, sobreposta a uma rampa de potencial em formato de escada, figura 8 (WANG, 2001; SOUZA *et al.*, 2003).

A SWV é uma técnica eletroquímica poderosa que pode ser aplicada em medições eletrocinéticas e analíticas, tratando-se de uma técnica com maior velocidade de análise quando comparada com a DPV. Além disso, em SWV há um menor consumo de espécies eletroativas, minimizando problemas relacionados à saturação da superfície analítica, e ainda grande parte da corrente capacitiva é removida pela redução do oxigênio molecular dissolvido na matriz analítica, desta forma, a SWV se mostra ainda mais sensível do que DPV (BRETT & OLIVEIRA-BRETT, 1993; DOGAN-TOPAL *et al.*, 2010).

Figura 8. a) Potencial aplicado no eletrodo de trabalho em SWV e b) Voltamograma de Onda Quadrada (E vs I) indicando a corrente total (ΔI), anódica ou

de oxidação $I(1)$ e catódica ou de redução $I(2)$. Fonte: BRETT e OLIVEIRA-BRETT, 1993.



1.4.4.2 Sensores Eletroquímicos

Em métodos eletroquímicos o eletrodo de trabalho atua como um sensor químico e este pode ser definido como um dispositivo que fornece resposta diretamente ligada à quantidade de uma espécie química específica. Sensores eletroquímicos são especialmente atraentes devido a alta sensibilidade e seletividade, além de um curto tempo de análise e pequenos volumes de amostra. Características estas, que têm levado a uma crescente busca por metodologias que utilizam estes sensores em diferentes áreas como ambiental, alimentar, farmacêutica ou clínica (JANATA, 2001). O desenvolvimento e utilização de sensores tem sido um importante avanço. Cada vez mais, novas técnicas e materiais são testados e as possibilidades de aplicação aumentam (MELLO *et al.*, 2006; PRIETO-SIMON *et al.*, 2008; GIL & MELO, 2010).

Todos os sensores eletroquímicos são constituídos por um transdutor, que transforma a resposta num sinal detectável, e uma camada quimicamente seletiva, que isola a resposta do analito alvo, estas duas partes formam o eletrodo (FARIDBOD *et al.*, 2011). O desempenho dos sensores está fortemente ligado ao

material do eletrodo de trabalho. Consequentemente, muito esforço tem sido dedicado à fabricação e manutenção de eletrodos. Os eletrodos sólidos (carbono, platina, ouro, prata, níquel, cobre) têm sido muito populares principalmente por causa de sua janela de potencial versátil, baixa corrente de fundo e adequação para várias detecções e aplicações (STRADIOTTO *et al.*, 2003).

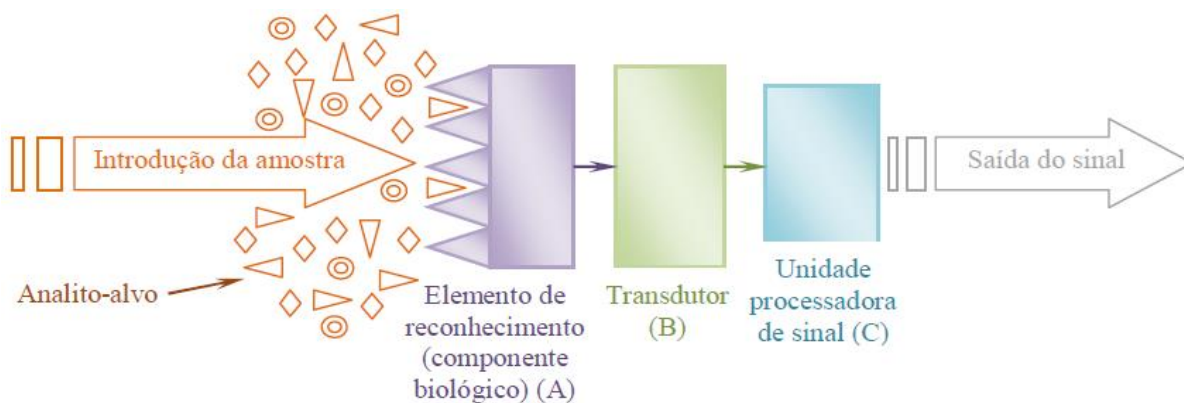
Eletrodos à base de pasta de carbono consistem em uma mistura de grafite em pó e um aglutinante, geralmente óleo mineral. Este tipo de eletrodo permite adição de um ou mais modificadores, dando origem aos eletrodos quimicamente modificados (EQM), que permitirá obter características vantajosas como alta sensibilidade e seletividade de um ou mais analitos de interesse. As características vantajosas de um EQM são verificadas quando se compara a resposta eletroquímica deste com a de um eletrodo de pasta de carbono sem modificação (SOTOMAYOR *et al.*, 2006).

A proliferação de eletrodos quimicamente modificados (EQM) gera uma abordagem moderna aos sistemas de eletrodos, onde a modificação da superfície deste eletrodo pode ocorrer de diversas maneiras, como por exemplo, pelo uso de enzimas (biossensor) ou pelo uso de um composto que imita a estrutura química do sítio ativo de uma enzima (biomimético) (SOTOMAYOR *et al.*, 2006).

1.4.4.2.1 Biossensores e sensores biomiméticos

Os biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos alvo. Um biossensor contém um componente biológico acoplado a um transdutor que interage com um substrato alvo, que produz um sinal proporcional à concentração do analito, figura 9, (WANG, 2000; PATHAK *et al.*, 2007).

Figura 9. Componentes de um biossensor. A detecção do analito alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C). CALIL, 2011.



Biossensores amperométricos se baseiam na medida da corrente resultante da oxidação/redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, ocorrendo transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa. (THÉVENOT *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2008).

Os biossensores podem ser desenvolvidos com base em enzimas, tais como lacase, tirosinase ou peroxidase. A base de lacase, por exemplo, segue um modelo de oxidação bioquímica seguida por redução eletroquímica detectada amperométricamente, podendo ser usado para detecção de polifenóis que estão presentes em vários extratos, alimentos e bebidas (MELLO *et al.*, 2006, GARCIA *et al.*, 2015). Além deste, tem-se os biossensores baseados na atividade de eliminação de radicais livres, utilizando ROS em suas configurações. Dentre estes, tem os biossensores de DNA, os quais permitem o monitoramento da integridade do DNA ou de suas bases nitrogenadas (BARROSO *et al.*, 2011), e os biossensores de imobilização de enzimas tipo citocromo c ou superóxido dismutase, baseados na dismutação enzimática seletiva de $O_2^{\cdot -}$ em O_2 e H_2O_2 , seguido por detecção amperométrica (GE e LISDAT, 2002; CAMPANELLA *et al.*, 2004; EMREGÜL, 2005).

Diante da grande seletividade dos biossensores, surgem os chamados sensores biomiméticos, nos quais o eletrodo é modificado com uma substância com estrutura análoga a algum biocomponente tomado como modelo. Estes dispositivos apresentam vantagens para com os biossensores convencionais, tais como disponibilidade, custo, estabilidade e uma melhor transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo análogo/substrato, visto que nos sensores biomiméticos há um menor impedimento estérico (SOTOMAYOR & KUBOTA, 2002).

O desenvolvimento e utilização de sensores tem sido um importante avanço em diversas áreas. Cada vez mais, novas técnicas e materiais são testados e as possibilidades de aplicação aumentam. Dentre a vantagens destes sistemas estão

a alta sensibilidade e seletividade, além de um curto tempo de análise e pequenos volumes de amostra (MELLO *et al.*, 2006; PRIETO-SIMON *et al.*, 2008; GIL & MELO, 2010).

1.5. Identificação dos compostos majoritários

Várias técnicas tradicionais de separação analítica têm sido usadas para identificação de compostos fenólicos, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), restrita devido a volatilidade dos compostos, logo menos usada, e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com diferentes detectores, atualmente mais popular e confiável técnica para a análise de ácidos fenólicos, polifenóis e flavonóides naturais (JANDERA, 2009).

A determinação de antioxidantes, por HPLC, em frutas, vegetais, extratos de plantas e bebidas tem aumentado continuamente desde os anos 90. Há uma atenção especial para a identificação de alguns compostos, que apresentam atividade quimiopreventiva, como o xantohumol (MIRANDA *et al.*, 2000), quercetina e rutina (CARERI *et al.*, 2000) e transresveratrol (CALLEMIEN *et al.*, 2005).

A detecção do tipo PDA (*photodiode array*) acoplada ao sistema de HPLC, dita HPLC-PDA, é capaz de fazer varreduras que abrangem toda a faixa do ultravioleta e visível. Este tipo de acoplamento é amplamente utilizado principalmente por conta que o monitoramento de apenas um comprimento de onda, como é o caso do HPLC-UV/VIS, não é ideal para uma matriz complexa, onde há uma mistura de classes que absorvem em diferentes regiões. Por exemplo, em cerca de 280 nm os ácidos fenólicos e flavononas possuem uma melhor absorção, entretanto para flavonas e flavonóis o melhor é 265 nm, já para as antocianinas utiliza-se 360 nm (CARERI *et al.*, 2000).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) tem revolucionado as análises de compostos não voláteis presentes em amostras de alimentos e bebidas, que normalmente são matrizes complexas. O sucesso de LC/MS foi alcançado principalmente com o uso de técnicas de ionização a pressão atmosférica, como o *electrospray* (ESI). A partir de então os principais estudos foram no sentido de analisar compostos naturais polares e termicamente instáveis. Vários pesquisadores utilizam a ESI para o estudo de flavanóis (DE PASCUAL-TERESA *et al.*, 1998; KENNEDY *et al.*, 2001), compostos fenólicos e flavonóides (CARERI *et al.*, 1998), flavonas e flavonóis (DE PASCUAL-TERESA *et al.*, 2000) e na identificação

de proantocianidinas em extratos de malte (FRIEDICH *et al.*, 2000) e da cerveja (WHITTLE *et al.*, 1999).

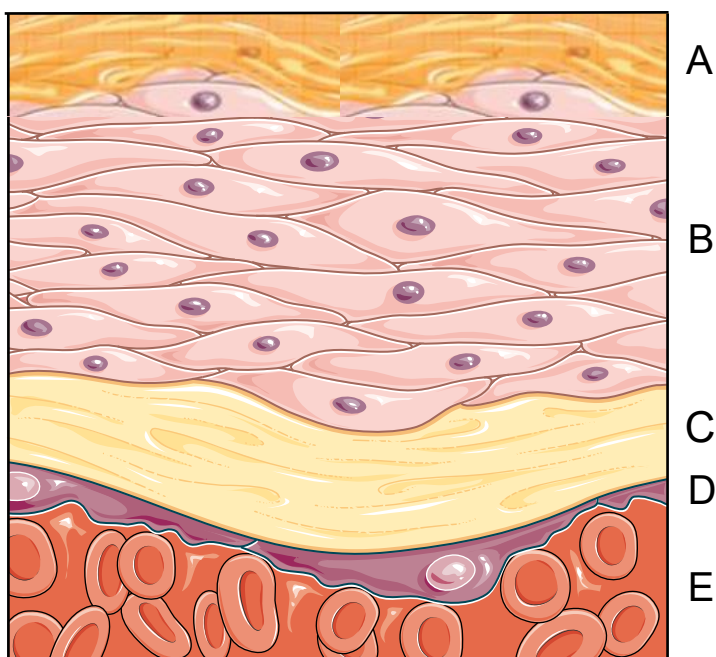
1.6. Atividade protetora do sistema vascular

Entre os diversos constituintes presentes na cerveja, aqueles com a supracitada ação antioxidante apresentam relevantes atividades biológicas. Dentre estas destaca-se a proteção do ataque de radicais aos vasos sanguíneos, preservando a integridade da função endotelial e efeito vasorrelaxante. Assim, é interessante investigar também a contribuição destes compostos em relação aos possíveis benefícios trazidos pela cerveja para o sistema cardiovascular, visto que já há relatos do efeito vasorrelaxante de flavonóides (WOODMAN *et al.*, 2005; BABAEI *et al.*, 2008).

1.6.1 Estrutura dos vasos sanguíneos e função endotelial

Os vasos sanguíneos possuem três camadas básicas que são organizadas circundando um canal central, a luz do vaso, por onde percorre o sangue. Essas camadas são distinguidas em camada adventícia, camada intermediária e a camada endotelial, figura 10, (SHOEN, 1996).

Figura 10. Estrutura do vaso sanguíneo mostrando suas diferentes camadas: A) Adventícia; B) Intermediária; C) Membrana elástica; D) Endotelial; E) Fluxo sanguíneo. Fonte: Adaptada de Servier Medical Art – Powerpoint Image Bank.



A camada mais externa da parede vascular, denominada camada adventícia, possui espessura variável de acordo com o tipo de vaso sanguíneo e sua localização, sendo composta basicamente por tecido conjuntivo denso constituído por fibras colágenas e terminações nervosas que são responsáveis pela liberação de diferentes fatores com atividade vasoativa (SHOEN, 1996).

A camada intermediária é a camada mais espessa, composta basicamente por células de músculo liso e elastina, nesta camada ocorre processos vasculares responsáveis pela diminuição no diâmetro do vaso, que resulta na contração, ou, aumento neste diâmetro, resultando em relaxamento. O mecanismo de contração das células de músculo liso ocorre como consequência do aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} , sendo este proveniente de estoques intracelulares e/ou extracelular. Para que ocorra a contração, o Ca^{2+} livre no meio intracelular liga-se à calmodulina, sendo este complexo responsável pela ativação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), a qual adiciona um fosfato à cadeia leve de miosina (MLC), permitindo a interação com os filamentos de actina, promovendo assim a contração muscular (WEBB, 2003). O relaxamento do músculo liso vascular geralmente ocorre em consequência da diminuição dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , o que resulta na desfosforilação da MLC pela miosina fosfatase (MICHEL, 1998).

A camada endotelial é composta por uma camada única de células endoteliais e está em contato direto com o sangue. Nestas células são produzido e liberado diferentes fatores relacionados à homeostase vascular, dentre eles a manutenção do tônus vascular. Dentre as principais funções do endotélio no que diz respeito à homeostase vascular, destaca-se os fatores vasorrelaxantes em que pode ocorrer a ativação da sintase de óxido nítrico (NO) endotelial (eNOS), síntese de prostanóides vasodilatadores e produção do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF – do inglês *endothelium-derived relaxing factor*). Ambos os fatores possuem uma função comum na camada de músculo liso, que é promover a diminuição dos estoques intracelulares de cálcio e consequente relaxamento vascular (GORMAN *et al.*, 1977; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FELETOU & VANHOUTTE, 1988; MICHIELS *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação específico do NO ocorre pela difusão rápida para as células musculares lisas vasculares estimulando a guanilato ciclase solúvel (GCs), que resulta no aumento da produção de 3',5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc), e este por sua vez, leva a redução da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) por meio da ativação da proteína quinase G (PKG), favorecendo o relaxamento

vascular (RAPOPORT e MURAD, 1983). A ativação da PKG age inibindo o influxo de Ca^{2+} , ativando assim canais de K^{+} dependentes de Ca^{2+} , que leva ao bombeamento de Ca^{2+} para fora da célula por meio da bomba de cálcio da membrana plasmática (MPCa). Este cálcio então é receptado pelo retículo sarcoplasmático (SERCA), por meio da proteína Ca^{2+} -ATPases. A PKG ainda, age inibindo a formação de trifosfato de inositol (IP3), reduzindo a liberação de Ca^{2+} induzida por IP3. Estes mecanismos convergem para favorecer a vasodilatação (RAPOPORT e MURAD, 1983; SANDOO *et al.*, 2010).

Conforme foi exposto, o presente trabalho se propõe avaliar a capacidade antioxidante e a atividade vasorrelaxante de amostras de cervejas, visto os diversos compostos que podem estar presentes nas mesmas. Portanto, diante da revisão previamente descrita, este trabalho surge para contribuir com dados a cerca da qualidade no processo de fabricação das cervejas e também no sentido de expandir os conhecimentos em torno dos benefícios e malefícios à saúde humana de uma das bebidas mais consumidas mundialmente.

2.1. Objetivo geral

- Determinar a capacidade antioxidante e a atividade vasodilatadora de diferentes cervejas comerciais.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a capacidade antioxidante via métodos clássicos espectrofotométricos, DPPH e ABTS, das cervejas, do lúpulo e do malte;
- Determinar a capacidade antioxidante via métodos eletroquímicos, utilizando o índice eletroquímico, das cervejas, do lúpulo e do malte;
- Avaliar e comparar a capacidade antioxidante de cervejas de diferentes categorias por meio de métodos espectrofotométricos e eletroquímicos;
- Determinar os fenóis totais das amostras de cervejas, de lúpulo e de malte, por meio do método de *Folin-ciocalteu*;
- Identificar os principais constituintes presentes nas amostras de cervejas, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- Correlacionar e comparar os constituintes identificados com o potencial antioxidante;
- Verificar o potencial vasorrelaxante de amostras de cervejas selecionadas deste estudo;
- Verificar a ação protetora de uma amostra de cerveja por meio do ensaio de inibição da peroxidação lipídica e também via sensor de adenina.

3.1. Reagentes e Padrões

Os reagentes 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), *Folin-Ciocalteu*, 1,1- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e os padrões de polifenóis foram todos adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os sais utilizados, tanto na parte eletroquímica quanto na parte farmacológica, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de potássio bibásico anidro, acetato de sódio trihidratado foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Diadema, SP, Brasil). Acetonitrila e ácido fórmico utilizados foram grau HPLC (Tedia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água ultrapura, 18,2 MΩ, foi obtida pelo sistema ultrapurificador de água Gehaka Master A&D TOC (São Paulo, SP, Brasil).

3.2. Amostras

3.2.1 Cervejas

As amostras foram adquiridas em cervejarias e mercados da cidade de Goiânia. Foram separados dois grupos, *ale* e *lager*, cada um contendo seis amostras, que foram escolhidas de forma aleatória devido a grande quantidade de marcas e variedades existentes no mercado.

As amostras foram divididas em duas porções, a primeira para os ensaios espectrofotométricos e eletroquímicos, a qual foi utilizada de forma *in natura*. E a segunda parte foi liofilizada com objetivo de padronizar a concentração de uso, de retirar o álcool e garantir uma maior durabilidade das mesmas, e então utilizada nos ensaios farmacológicos e cromatográficos.

3.2.2 Lúpulos e maltes

As amostras foram adquiridas na empresa Indupropriil, sendo que as amostras de lúpulo foram dos tipos: barth-haas, columbus, cascade e hallertau, e as amostras de malte dos tipos: chateau cristal, chateau munich, pilsen e trigo.

Todas as amostras foram extraídas com água quente, 60 °C durante 30 min. Esta extração foi utilizada no intuito de simular o aquecimento do processo de

fabricação de cerveja. O extrato de lúpulo foi preparado a 1% (m/v), enquanto o extrato de malte a 40% (m/v), esta diferença foi realizada para aumentar a resposta analítica do malte.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 10 a 12 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás e mantidos no Biotério dos Departamentos de Farmacologia e Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas, mantidos sob ciclo claro (7 h - 19 h) e escuro (19 h - 7 h) à temperatura de 22 ± 1 °C e com livre acesso à ração e água. Os protocolos experimentais seguiram as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas institucionais do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEUA/UFG 20/2013).

3.4. Ensaios espectrofotométricos

As medidas de absorbância foram registradas com um Q798U2VS espectrômetro (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil). Todas as amostras foram analisadas em uma cubeta de 1 cm.

3.4.1 Amargor, cor e teor de álcool

O amargor foi determinado de acordo com a metodologia de Philpott, Taylor e Williams (1997) com algumas modificações. Em 2 mL de amostra de cerveja foram adicionados 200 µL de HCl 3 mol/L, 4 mL de isooctano e uma gota de álcool octílico. Em seguida esta mistura foi agitada vigorosamente por 10 minutos e então centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e medido espectrofotometricamente a 275 nm, utilizando como branco a mistura de todos os solventes supracitados na ausência da amostra. Os resultados foram expressos seguindo a equação 2.

$$\text{IBU} = \text{Abs}_{275\text{nm}} \times 50 \quad (2)$$

Onde IBU vem do inglês *International Bitterness Unit*.

A cor foi determinada seguindo o método oficial da *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) (beer 10a). Onde a absorbância das amostras *in natura* foi medida a 430 nm. Os resultados foram expressos em EBC (*European Brewery Convention*), seguindo a equação 3.

$$\text{EBC} = \text{SRM} \times 1,97 \quad (3)$$

Onde SRM é do inglês *Standard Reference Method* e foi obtido a partir da equação 4.

$$\text{SRM} = 12,7 \times D \times A_{430\text{nm}}, \quad (4)$$

Onde D é o fator de diluição utilizado, caso necessário.

O teor de álcool das amostras foi obtido das informações contida nos rótulos das mesmas.

3.4.2 DPPH

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina havendo assim descoloração da solução (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). A absorbância inicial ($A = 0,7$) foi obtida através da mistura de 2,7 mL da solução etanólica de DPPH e 0,3 mL de etanol, medida em 517 nm. O branco foi ajustado com etanol. Para a análise da amostra foi feita a adição de 0,3 mL da amostra em 2,7 mL do DPPH, a reação foi centrifugada durante 5 min no escuro à temperatura ambiente. A atividade antioxidante foi expressa como IC₅₀, representando a quantidade das amostras, em mL, necessária para descolorir 50% da solução inicial de DPPH.

3.4.3 ABTS

O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução de ABTS 7 mmol/L com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mmol/L (RUFINO *et al.*, 2007). A mistura foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, 1 mL desta mistura foi diluída em etanol até a obtenção de absorbância próxima a 0,70 a 734 nm. Para a análise da amostra foi feita a adição de 25 µL da amostra em 3,0 mL do radical ABTS, a reação foi centrifugada durante 5 min no escuro à temperatura ambiente. A atividade antioxidante foi expressa como IC₅₀, representando a quantidade das amostras, em mL, necessária para descolorir 50 % da solução do radical ABTS.

3.4.4 Folin-Ciocalteu

O método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON & ROSSI, 1965; SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) foi utilizado para determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais. Em balão de 10 mL, foram adicionados 100 µL de amostra ou padrão de ácido gálico, 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Após 2 minutos, foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v), a solução então foi homogenizada e o volume foi aferido com água destilada. A solução foi centrifugada e permaneceu por 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Em seguida a absorbância em 765 nm foi determinada em espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi calculado como equivalente de ácido gálico por comparação com uma curva padrão construída usando ácido gálico (0,1-20 µg/mL) e foi expresso em miligramas de equivalente a ácido gálico.

3.4.5 Determinação da atividade de inibição da peroxidação lipídica

A atividade de peroxidação lipídica foi determinada de acordo com o método de Liu & Ng (2000). Foram preparados homogenatos cerebrais 1:10 (cérebro:tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). O homogenato então foi centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio de peroxidação lipídica *in vitro*. Foi investigada a habilidade das amostras de cervejas selecionadas em inibir a peroxidação lipídica frente a ação do peróxido de hidrogênio neste meio. O peróxido de hidrogênio promove a peroxidação e os produtos formados reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um produto rosa. Em seguida, a absorbância em 532 nm foi determinada em espectrofotômetro.

3.5. Ensaio eletroquímicos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB® da Eco Chemie (Holanda), controlado pelo software GPES PGSTAT 20 versão 4.3., conectado a uma célula eletroquímica com sistema de três eletrodos, o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar de espiral de platina e o eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl_(sat). O eletrodo de trabalho utilizado foi o de pasta de carbono, constituído de 75% de pó de grafite e 25% de óleo mineral.

Para aplicar a voltametria cíclica os seguintes parâmetros foram usados: velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e intervalo de potencial de 0 to 1 V. Para voltametria de onda quadrada: amplitude de pulso de 50 mV, frequência 50 Hz e

incremento de 2 mV, correspondendo a uma velocidade efetiva de varredura de 100 mV s⁻¹. E para voltametria de pulso diferencial: amplitude de pulso de 50 mV, largura de pulso de 0,5 s e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Todos os voltamogramas foram plotados com o auxílio do software Origin 8®.

3.5.1 Índice Eletroquímico

Para a obtenção do índice eletroquímico a equação 5 foi aplicada. Na qual o pico de potencial (E_{pa}), trata-se de um parâmetro termodinâmico, relacionado com a alta capacidade de doar elétrons, e o pico de corrente (I_{pa}) trata-se de um parâmetro cinético, relacionado com a quantidade de espécies eletroativas presentes (ESCARPA, 2012; LINO *et al.*, 2014).

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (5)$$

3.5.2 Sensor de adenina

O sensor foi construído com pó de grafite e óleo mineral 75:25 g/g e então foram adicionados 100 µL de adenina a 1 mg/mL. Em seguida esta mistura foi levada ao forno por 2 horas a 35 °C.

O sensor foi submetido ao dano pelo contato com peróxido de hidrogênio e medidas voltamétricas foram realizadas na ausência e na presença da amostra de cerveja.

3.6. Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa LC-Q-TOF

As análises cromatográficas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas do Instituto de Química (LACEM-IQ), sob a coordenação do Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.

Antes de submeter as amostras na análise cromatográfica, as mesmas tiveram que passar por um pré-tratamento, com intuito de minimizar interferentes, principalmente açúcares. As amostras foram diluídas a 50 mg/mL, e então submetidas a extração em fase sólida. Foram utilizados cartuchos Oasis HLB 30 mg, onde, os mesmos foram condicionados com 1 mL de metanol seguido por 1 mL de água, foi então aplicado 1 mL da amostra, a etapa de lavagem foi feita com 1 mL de água e então a eluição foi feita com 1 mL de acetonitrila:água. Por fim, antes de injetar no sistema de cromatográfico, foi feita a filtração com filtro de seringa de 0,22 µm de poro.

O sistema cromatográfico utilizado foi um UFLC LC-20AD (Shimadzu, Japão) com duas bombas LC-20AD, contendo autoinjeter SIL-20AC_{HT} refrigerado a 15 °C e detector de UV. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas micrOTOF-Q II (Brucker Daltonics, USA) operando com fonte *eletronspray* (ESI) no modo negativo a 180 °C. Energia de ionização aplicada foi de 4000 V. Nitrogênio foi utilizado como *dry gas* e na cela de colisão, o nitrogênio de alta pureza foi produzido por um gerador de nitrogênio da PEAK Scientific Instruments (Chicago, IL, USA). O espectrômetro foi programado no modo AutoMSMS, onde experimentos MSMS foram feitos durante toda a corrida cromatográfica.

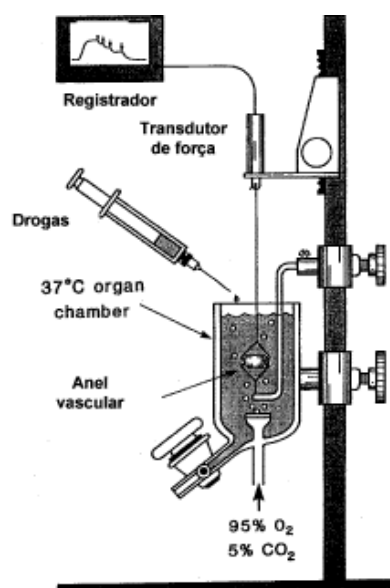
A separação foi realizada em uma coluna RP-C18 (100 mm x 2.1 mm, 5 µm) (Shimadzu, Japão), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por uma mistura de água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O fluxo da fase móvel foi 200 µL/min e o volume de injeção foi 10 µL.

3.7. Reatividade Vascular

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Farmacologia e Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

Os animais sofreram eutanásia por decapitação. Em seguida, as aortas torácicas foram removidas e imersas imediatamente em solução nutriente Krebs-Henseleit à 4 °C (pH 7,4; concentração em mM: NaCl-130; NaHCO₃-14,9; KCl-4,7; KH₂PO₄-1,18; MgSO₄.7H₂O-1,17; CaCl₂.2H₂O-1,6; glicose-5,5). Logo após, foi feita a retirada do tecido conectivo e gorduroso do vaso, que foi seccionado em anéis transversais de 4 mm de largura. Os anéis vasculares foram suspensos por um par de hastes de aço inoxidável, em cubas de vidro de 10 mL contendo a solução nutritiva de Krebs-Henseleit sob temperatura de 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (O₂/CO₂ 95:5). Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força, que acoplado a um sistema computadorizado permitiu o registro das contrações, conforme pode ser visto na figura 11.

Figura 11. Representação esquemática do banho de órgãos utilizado para o estudo da reatividade vascular.



As preparações foram estabilizadas sob tensão de 1,5 g, com trocas de solução nutritiva e ajuste de tensão a cada 15 minutos, totalizando 60 minutos. Após estabilização, foi adicionada fenilefrina (Phe 1 μ M) para verificação do estímulo contrátil e, na sequência, acetilcolina (ACh 10 μ M) para a confirmação da presença ou ausência de endotélio. Para avaliação de aortas desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por fricção no lúmen do vaso, com o auxílio de cânula metálica coberta de algodão. Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela ACh correspondeu a 90% e, para anéis sem endotélio, aqueles cujo relaxamento máximo produzido correspondeu a 10%. Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada e posteriormente reestabilizadas por mais 30 minutos.

A geração da força isométrica foi registrada com o transdutor de força isométrica (AQCAD, AVS Projetos, São Carlos, Brasil).

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas utilizadas foram a matriz de correlação de Pearson, análise de componentes principais (PCA), análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Os softwares utilizados foram Graphpad Prism, XLstat e Origin 8®.

Os resultados referente a esta tese estão na forma dos artigos que se seguem nesta sessão, seguindo as normas das revistas *Journal of Functional Foods* e *Electroanalysis*, as quais estão dispostas nos anexo 1 e 2, respectivamente.

Artigo 1: **Antioxidant potential and vasodilatory activity of commercial beers**

Artigo 2: **Antioxidant capacity and total phenol content in hop and malt commercial samples**

Ressaltam-se aqui, importantes produções alinhadas a temática principal deste projeto em questão e que foram obtidas durante o período do doutorado: um trabalho apresentado em forma de pôster; dois trabalhos apresentados de forma oral e três artigos devidamente publicados, conforme descritos abaixo e constantes nos apêndices desta tese.

a) Trabalhos apresentados em congressos:

- 1- Trabalho apresentado em forma oral no *I Workshop de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica*. Atividade antioxidante e composição química de diferentes categorias de cervejas e suas correlações. Dezembro 2014, Goiânia-GO.
- 2- Trabalho apresentado em forma oral no *XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*. Determinação eletroquímica e espectrofotométrica da capacidade antioxidante de cervejas de diferentes marcas e classes. Agosto 2015, Uberlândia-MG.
- 3- Trabalho apresentado na forma de pôster no 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry. Antioxidant Activity of Beer using a Carbon Paste Adenine-Biosensor. Agosto 2016, The Hague, Holanda.

b) Artigos Publicados:

Artigo 1

Benjamin, S. R., **Oliveira-Neto, J. R.**, Macedo, I. Y. L., Bara, M. T. F., Cunha, L. C., Carvalho, L. A. F., Gil, E. S. (2015). Electroanalysis for Quality Control of Acerola (*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products. *Food Analytical Methods*, 8 (1), 86-92.

Artigo 2

Oliveira-Neto, J. R., Rezende, S. R., Reis, C. F., Benjamin, S. R., Rocha, M. L., Gil, E. S. (2016). Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, 506-512.

Artigo 3

Macedo, I. Y. L., Garcia, L. F., **Oliveira-Neto, J. R.**, Leite, K. C. S., Ferreira, V. S., Ghedini, P. C., Gil, E. S. (2017). Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. *Food Chemistry*, 217, 326-331.

Jerônimo Raimundo Oliveira Neto^a, Thiago Sardinha de Oliveira^b, Paulo

César Ghedini^b, Boniek Gontijo Vaz^c, Eric de Souza Gil^{a,*}.

a Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74605-220, Brazil

b Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil

c Chemistry Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil
ericsgil@ufg.br

Abstract:

The antioxidant properties of commercial beers were examined by spectrophotometric and electroanalytical methods. Moreover, such properties were correlated with their main phenolic compounds as well as vasodilatory effects. Ale group showed better antioxidant activity and total phenols content (TPC) values than lager group. The highest electrochemical Index (EI) was observed for LB10 and AB1. Principal Components Analysis (PCA) showed three groups, where group III confirm LB10 and AB1 like the best antioxidant potential. LB10, AB1 and AB6 showed vasodilatory effect of 92 ± 4 , 88 ± 3 and 79 ± 3 %, respectively. Both the vasodilator effect and the lipid peroxidation inhibition capacity may be associated with the presence of phenolic compounds as caffeic acid, catechin and isoxanthohumol, identified by mass spectrometry. The results showed here expand knowledge about beer, which might be helpful for further research on the health, sensory properties and quality parameter of this beverage worldwide consumed.

Keywords: beer, antioxidant potential, vasodilation, phenolic compounds.

1. Introduction

Beer is widely consumed around the world, being the third most consumed beverage, and the first among the alcoholic beverages (Nelson, 2005; Wunderlich & Back, 2009).

According to the brewing processes and ingredients the beer varieties are huge. The brewing can be carried on high or low fermentation temperatures. Lager beers, the most popular worldwide, are produced with strains of *Saccharomyces calshbergensis*, being fermented at temperatures from 3.3 to 13.0 ° C for 4 to 12 weeks. On the other hand, ale beers are typically fermented at warmer temperatures (c.a. $20 \pm 4^{\circ}$ C) for shorter periods with the top strain, *Saccharomyces cerevisiae*, being more prevalent in northern countries, *i.e.* Germany, Belgium, Canada, the United States and Britain (Araújo *et al.*, 2003; Pavsler & Buiatti, 2009; Wunderlich & Back, 2009; Cervesia; Sindcerv, 2014).

Besides the socio-cultural aspects related to beer consumption, this beverage has recognized nutritional functions. For instance, the polyphenols found in beer, akin to wine, exert protection against cardiovascular diseases and cancer (Ghiselli *et al.*, 2000; Duthie *et al.*, 2000; Bobak *et al.*, 2000; Gerhäuser, 2005; Onâte-Jaén *et al.*, 2006; Fegredo *et al.*, 2009).

Phenolic compounds, despite their major role on sensorial characteristics, *i.e.* color and flavor, are excellent electron donors, acting as antioxidant preservatives in foodstuffs and radical scavengers in physiological systems (Sousa *et al.*, 2007; Jandera, 2009). Thus, owing to the health properties of beers, in which the phenolic antioxidants play an important role, it is indispensable to have methods capable of measuring antioxidant activity (AA) (Sharma *et al.*, 2005; Onâte-Jaén *et al.*, 2006; Fegredo *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009; Gülçin, 2012). Whereas their nutraceutical properties become the target of studies.

Among traditional methods the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and DPPH• (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assays, that are easy and have a low cost (Basnet *et al.* 1996). These methods are based on discoloration of solution by electron and hydrogen atom transfer mechanism of antioxidants. Nevertheless, in complex matrices, there are many compounds that can absorb in the same wavelength range, causing interference in these assays (Basnet *et al.* 1996). In the same way, the Folin-Ciocalteu (FC) method, for Total phenols contents (TPC), is often overestimated in complex matrices by the

low selectivity of FC reagent. (Basnet *et al.*, 1996; Singleton *et al.*, 1999; Blasco *et al.*, 2007; Escarpa, 2012; Lino *et al.*, 2014; Oliveira-Neto *et al.*, 2016).

Hence, the electrochemical methods upsurge as alternatives, insofar as present many advantages such as simplicity, quickness, sensitivity and low consume of sample and reagent (Kilmartin & Hsu, 2003; Blasco *et al.*, 2007; Escarpa, 2012; Lino *et al.*, 2014).

The electroanalysis by enabling the interpretation of the redox behavior of crude samples allow assumptions about specific antioxidant classes (Kilmartin & Hsu, 2003; Blasco, González and Escarpa, 2004). whereas the electrochemical index express their antioxidant capacity, as pionner introduced by Escarpa research group (Blasco, González and Escarpa, 2004; Blasco *et al.*, 2005) and confirmed by our group (Lino *et al.*, 2014; Oliveira-Neto *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2017). Therefore, the aim of this work was to investigate and correlate phenolic profiles and antioxidant activities. As well as investigate vasodilation evaluation and the protective evaluation, through lipid peroxidation assays and construction of DNA biosensors analogous, of commercial beers.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Ethanol, 1-octanol, isooctane were analytical grade from was supplied by J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Potassium phosphate, Sodium carbonate, potassium persulfate and hydrochloric acid (fuming 37 %) were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Folin–Ciocalteu reagent, gallic acid (GA), Phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh), N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All electrolyte solutions were prepared using analytical grade reagents and double distilled water obtained from Gehaka Master A&D TOC system (São Paulo, Brazil). To vascular reactivity the drugs was prepared as stock solutions in distilled water.

2.2. Samples

Twenty-two beers commercial brands were purchased at local markets of the metropolitan area of Goiania, Brazil. Trademark names were omitted and represented by codes, according the color. Beers were classified according to the

Guidelines of the Beer Judge Certification Program (BJCP, 2008) in two types, ale beer (AB1 - AB11) and lager beer (LB1 - LB11), table 1, chosen at random. All the samples were degassed by sonication. Samples were divided in two portions, one for spectrophotometer and electrochemical assays stored in amber tubes at -20 °C until analysis. And the second part was lyophilized, aiming to standardize the use concentration and better durability of the same, and then used in pharmacologic and chromatographic assays.

Table 1. Identification and physicochemical properties of commercial beers analyzed in this study.

Fermentation type	Code	Color (EBC)	Bitterness (IBU)	Alcohol content (%)
Ale	AB1	8.9	9.5	4.8
Ale	AB2	10.9	9.2	5.2
Ale	AB3	12.0	10.0	5.5
Ale	AB4	19.6	22.0	4.8
Ale	AB5	21.1	35.0	7.0
Ale	AB6	24.6	17.8	8.5
Ale	AB7	37.4	17.0	6.5
Ale	AB8	85.7	5.0	3.8
Ale	AB9	134.6	24.3	6.0
Ale	AB10	215.0	30.0	4.3
Ale	AB11	220.9	20.0	7.5
Lager	LB1	3.2	4.4	0.0
Lager	LB2	5.6	9.0	5.0
Lager	LB3	5.9	8.0	4.7
Lager	LB4	6.0	9.0	4.5
Lager	LB5	6.1	10.0	4.9
Lager	LB6	7.5	12.0	5.0
Lager	LB7	8.5	12.0	4.8
Lager	LB8	8.5	16.0	5.2
Lager	LB9	8.7	16.0	5.0
Lager	LB10	10.5	14.9	5.0
Lager	LB11	102.6	17.1	4.8

2.3. Animals

All experimental protocols were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institutional Ethics in Research Committee at the Federal University of Goiás, Goiás, Brazil (Protocol CEP/UFG 20/2013). Male Wistar rats, 10-12 weeks of age were used and maintained on a 12

h light/dark cycle under a controlled temperature (22 ± 1 °C) with *ad libitum* access to food and water.

2.4. Spectrophotometric assays

The absorbance measurements were recorded with a spectrometer Q798U2VS (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brazil). All samples were analyzed in a glassy cell of a 1 cm at room temperature.

2.4.1. Physicochemical attributes

Bitterness was determined according to Philpott, Taylor, and Williams (1997) with some adaptations. In 2 mL of sample were add 200 μ L of 3 mol/L HCl, 4 mL of isooctane and a drop of octyl alcohol. Tubes were then shaken for 15 min and centrifuged at 5,000 rpm by 10 min at room temperature. The supernatant was measured at 275 nm against a blank control (isooctane containing a drop of octyl alcohol). Results were expressed as follows equation.

$$\text{IBU} = \text{Abs}_{275\text{nm}} \times 50$$

Color was certain following the official method from ASBC (beer 10a). Where the absorbance was measured at 430 nm and European Brewery Convention (EBC) was obtained as equations below:

EBC= SRM x 1.97 , where SRM is Standard Reference Method and was calculated like follow:

$$\text{SRM} = 12.7 \times D \times A_{430\text{nm}}$$

Ethanol content were reported as described on the beer samples' labels.

2.4.2. DPPH

The radical scavenging activity assays were performed using the stable DPPH reagent, in accordance with very well established procedures (Blois, 1958; Brand-Williams *et al.*, 1995; Lino *et al.*, 2014; Oliveira-Neto *et al.*, 2016). In summary, the blank control was composed by a mixture of 2.7 mL of DPPH ethanolic solution (0.1 mM) and 0.3 mL of ethanol, in which the final absorbance at = 517 nm was of c.a. A = 0.7. The ethanol was used in order to adjust the baseline (A = 0.000). Antioxidant activity was expressed as IC₅₀, representing the amount (L) of sample solution to produce 50% of discoloration of DPPH relative to the blank control. All samples were analyzed in a 1 cm glassy cell length at room temperature and use five minutes for reaction.

2.4.3. Folin-Ciocalteu assays

For the determination of total phenolic content, the adapted Folin–Ciocalteu (FC) method was executed (Singleton & Rossi, 1965). Briefly, into 10 mL volumetric flask containing 2 mL of water, 0.5 mL of FC reagent and 1.5 mL of 20 % Na_2CO_3 solution were added 100 μL of the sample or gallic acid standard solution and then completed with distilled water. The reaction was kept in the dark at room temperature by 1 h. Finally, the solution was measured 765 nm against a blank sample. All determinations were performed in triplicate and compared to the standard curve, in order to allow to express the results by means of gallic acid equivalents (GAE).

2.4.4. ABTS

The radical scavenging activity assays were executed using the stable ABTS reagent, in accordance with very well established procedures (Rufino *et al.*, 2007). Briefly, $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical was prepared from of mixture of 5 mL of the ABTS solution (7 mmol/L) with 88 μL of potassium persulfate (140 mmol/L). The reaction was kept in the dark at room temperature by 16 hours. Blank control was made from 1 mL that $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical that was diluted until reached absorbance near 0.70 at 734 nm. The sample was performed with the addition of 25 μL of sample in 3.0 mL of $\text{ABTS}^{\cdot+}$, the reaction was centrifuged at room temperature by 5 min. Antioxidant activity was expressed as IC_{50} , representing the amount (L) of sample solution to produce 50% of discoloration of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ relative to the blank control.

2.4.5. Determination of lipid peroxidation inhibition activity

Lipid peroxidation activity was determined according to the method described by Liu and Ng (2000). After euthanasia, the rat brain was dissected and homogenized in ice-cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) to produce a 1/10 homogenate. The homogenate was centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C and the supernatant was used as liposome for in vitro lipid peroxidation assay. The ability of beer sample to inhibit lipid peroxidation was studied by incubating rat brain homogenates treated with hydrogen peroxide (10 μM) and different concentration of the samples. Hydrogen peroxide produce lipid peroxidation in the rat brain homogenates and the lipid peroxides reacts with thiobarbituric acid to form a pink product, thiobarbituric acid reacting substances, measurable colorimetrically at 532 nm. The difference between

the control and treated beer sample measured decrease in thiobarbituric acid reacting substances formation, reflecting reduced hydroxyl radical-induced lipid peroxidation.

2.5. Electroanalytical assays

Voltammetric experiments were accomplished with a potentiostat/galvanostat μ Autolab III[®] controlled by the GPES 4.9[®] software, Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands. The measurements were performed with a three-electrode system consisting of a carbon paste electrode, a Pt wire and the Ag/AgCl/KCl 3M, representing the working electrode, the counter electrode and the reference electrode, respectively. The experimental conditions for voltammetrics assays follow below:

For cyclic voltammetry (CV): scan rate of 100 mV s⁻¹ and scan range from 0 to 1 V; For square wave voltammetry (SWV): pulse amplitude 50 mV, frequency 50 Hz and a potential increment of 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 100 mV s⁻¹; and for differential pulse voltammetry (DPV): pulse amplitude 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate 10 mV s⁻¹. The DP voltammograms were background-subtracted and baseline-corrected, in the GPES software, and then all data were plotted on the software Origin 8[®].

All experiments were done in a 1.0 mL one-compartment electrochemical cell, at room temperature in triplicate (n = 3) and the main electrolyte used was the 0.1 M phosphate buffer (PBS), pH 5.0.

2.5.1. Electrochemical Index

To obtained the electrochemical index, the equation 1 was applied. Where peak potential (E_{pa}), is thermodynamic parameter, related to the higher capacity to donate electrons, and peak current (I_{pa}) is a kinetic parameter, correlated with the quantity of electroactive species (Blasco, González and Escarpa, 2004; Blasco *et al.*, 2005; Lino *et al.*, 2014).

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (1)$$

2.5.2. Adenine sensor

Biosensors based on an electrochemical transduction element and a nucleic acid biocomponent are alternative methods for AA in food analysis. The detection of

damage to the DNA or its bases belongs to one of the specific fields of analysis with DNA-based biosensors.

The sensor was prepared graphite powder:mineral oil (75:25) and then 100 μL of adenine 1 mg/mL was added, and dried in the oven for 2 hours at 35 °C. Afterward, DPV voltammograms were obtained from CPE-Ade before and after immersion in hydrogen peroxide and in the presence and absence of sample beer.

2.6. LC-ESI-QTOF conditions

The chromatographic system used was a UFLC LC-20AD (Shimadzu, Japan) with two LC-20AD pumps, containing SIL-20AHT autosampler refrigerated at 15°C and UV detector. The system was coupled to a microOTOF-Q II mass spectrometer (Bruker Daltonics, USA) operating with electrospray source (ESI) in negative mode at 180 °C. Applied ionization energy was 4000 V. Nitrogen used as dry gas and in the collision cell was produced by a nitrogen generator from PEAK Scientific Instruments (Chicago, IL, USA). The microOTOF QII mass spectrometer was programmed for scan low mass (50-1300 m/z) in the AutoMSMS mode, where MSMS experiments were done throughout the chromatographic run. The separation was performed on a RP-C18 (100 mm x 2.1 mm, 5 μm) column (Shimadzu, Japan), maintained at 30 °C. The mobile phase was composed of a mixture of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid (v / v). The flow of the mobile phase was 200 μL / min and the injection volume was 10 μL . The mass spectra were acquired and processed using data analysis software (Bruker Daltonics). The MS data were processed, and the elemental compositions of the compounds were determined from the m/z measurements.

2.7. Study of vascular reactivity

Vascular reactivity study was performed in an organ bath setting, as previously described (Oliveira *et al.*, 2016). After euthanasia, the thoracic aorta was quickly dissected and cleaned in a physiological solution, containing (mM) NaCl-130, NaHCO_3 -14.9, KCl-4.7, KH_2PO_4 -1.18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1.17, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -1.6, and glucose-5.5. The aorta were cut into rings segments of 4-mm mounted on two stainless-steel hooks and suspended in 10 mL organ bath containing a modified Krebs solution at 37 °C and bubbled with gas mixture (95% O_2 and 5% CO_2). Isometric force generation was recorded with an isometric force transducer (AQCAD, AVS Projetos, São Carlos, Brazil). A resting tension of 1.5 g was imposed on each ring, and the

rings were allowed to equilibrate for 1 h. Endothelium integrity was assessed by measuring the dilatory response to ACh (10 μ M) in Phe contracted vessels (1 μ M). For studies of endothelium-intact vessels, a ring was discarded if relaxation with ACh (10 μ M) was not 90% or greater. In some experiments, the endothelium of the aortic rings was mechanically removed by gently rolling the lumen vessel on a thin wire. For studies of endothelium-denuded vessels, the ring was discarded if there was any degree of relaxation by acetylcholine (10 μ M). After assessing the presence of functional endothelium, vascular tissues were allowed to recuperate for at least 1 h, during which time, the Krebs-Henseleit solution was replaced every 15 min, before any experiment protocol to start. After some washout and tension stabilization, the arterial rings were again pre-contracted with Phe and randomly exposed to cumulative concentrations (10^{-4} to 10^{-2} g/mL - final dilutions in organ bath) of the tested beer samples or vehicle (distilled water) (n = 5-7 per sample). To further analyze the relative contribution of endothelium nitric oxide (NO) to the relaxation induced by the beer samples, the experiments were repeated after incubation (30 min) with NO synthase inhibitor L-NAME (100 μ M).

2.8. Statistical Analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Pearson's correlation matrix between different assays. Principal Components Analysis were performed using antioxidant assays and physicochemical properties. Analysis of variance (one-way ANOVA) followed by post hoc tests (Tukey) were used to compare groups into different assays and in vasodilatory effect check. Differences were considered significant when $p < 0.05$. These statistical analyses were performed using xlstat and Graphpad Prism.

3. Results and discussions

3.1. Redox Profile

The oxidation behavior of beer samples was investigated by CV, DPV and SWV performed in the potential range 0 V until +1.0 V, in 0.1 M PBS, pH 5.0 for LB10 sample.

Figure 1A show the CV successive scans, in which can be observed two well defined anodic peaks 2a, at $E_{p2a} = 0.61$ V and 3a, at $E_{p3a} = 0.90$ V. On the reverse

scan is not possible to observe cathodic peaks, indicating the irreversibility of such process.

In turn, the SWV, figure 1B, and DPV, figure 1C exhibited three anodic process, 1a, 2a and 3a. In which the reversibility of peak 1a was evidenced by SWV. The same voltammetric profile was obtained for other beer samples.

The Figure 1C presents the baseline corrected DP successive scans in which the decrease of peak currents (2a and 3a) is typical for the electrooxidation of phenolic compounds, that show adsorptive and passivation behavior. Otherwise, the increase of anodic peak 1a, at $E_{p1a} = 0.25$ V, may be related to electroactive oxidation products in the same potential value of initial 1a peak.

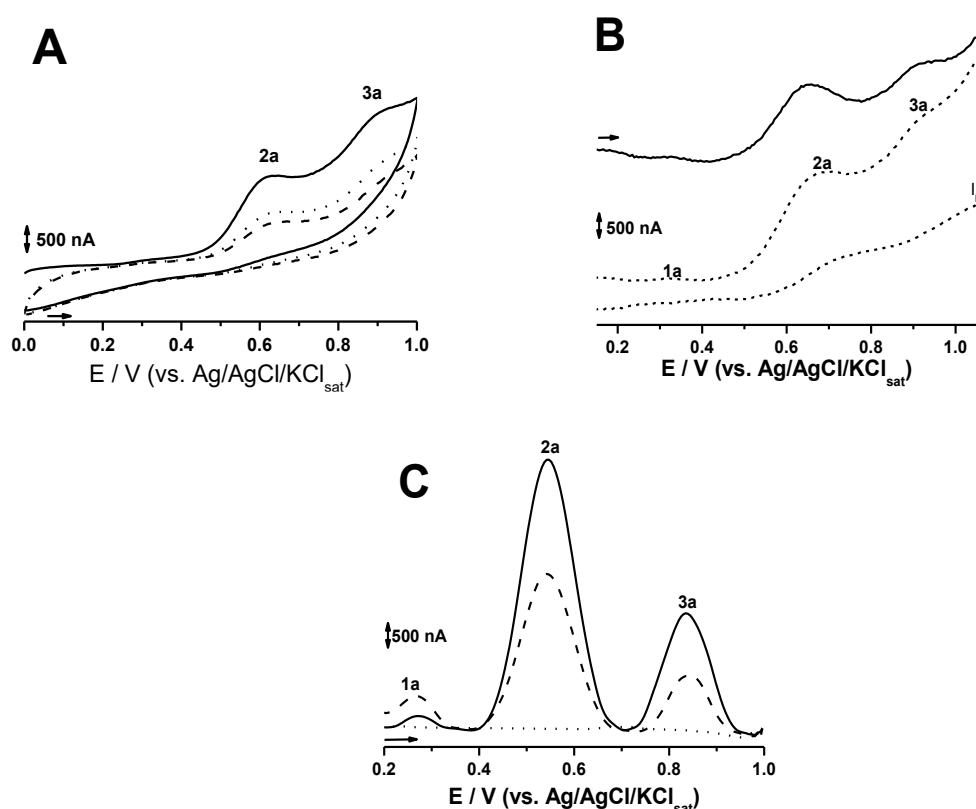


Fig. 1. Voltammetric Characterization and Redox Profile for LB10 sample obtained in 0.1 M phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode; (A)- First (—) and second scans (— — —) of cyclic voltammograms. Scan rate of 100 mV s^{-1} . (B)- SW voltammograms. Pulse amplitude of 50 mV, frequency of 22 Hz, effective scan rate of 90 mV s^{-1} . (C)- First (—) and second (— — —) successive DPV scans.

The DPV was performed in different pH conditions whereas the best resolution was achieved at pH 5, Fig. 2A. Hence this pH was used to determine the EI of all

beer samples. The peak potentials shift linearly from pH 2 to 9, being that the slope is nearby to theoretical value of 59 mV which agrees with a contribution of an equal number of electrons and protons involved in the redox process, Fig. 2B. Similar results were obtained for other beer samples.

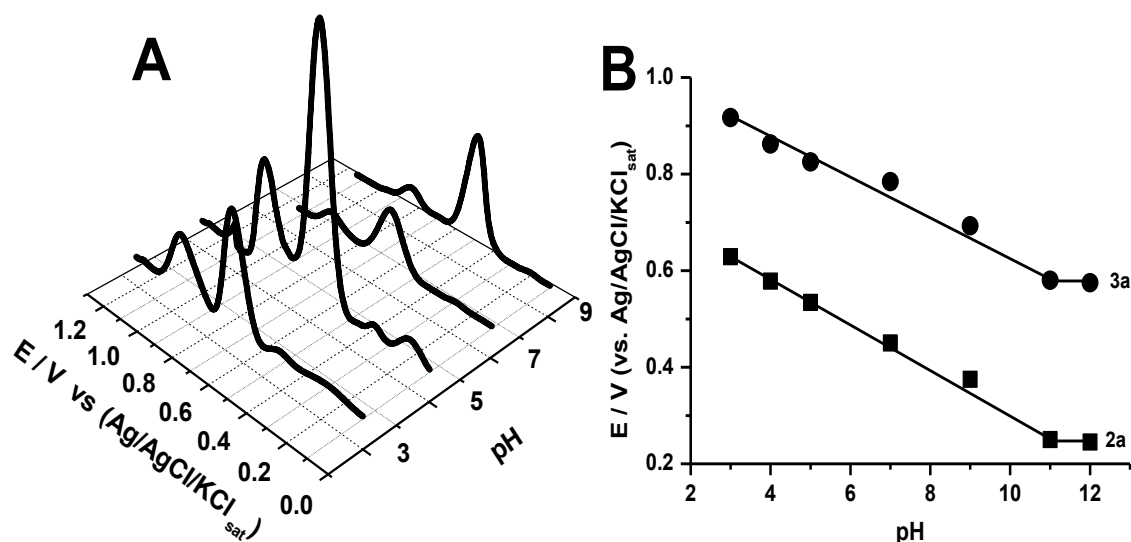


Fig. 2. (A) 3 D plots of DP voltammograms baseline corrected for beer sample (LB10) in different pH solutions. (B) E_{pa} vs pH plot. Pulse width of 5 mV, pulse amplitude of 50 mV, scan rate of 10 mV.s^{-1} .

3.2. AA Determinations

The antioxidant capacity of all beer samples was performed by spectrophotometric and electroanalytical methods, and the results are presented on and Table 2. From radical scavenging assays were obtained the amount of sample enough to reduce to the half the initial absorbance value, presented as IC_{50} (μL), and the TPC was expressed as gallic acid equivalent ($\mu\text{g/mL}$ of beer), whereas EI was obtained from each anodic peak by the sum of the ratios, I_{pa}/E_{pa} , in which the peak current expressed in μA and peak potential in mV, as equation 1 described in experimental section.

Table 2. Electrochemical index and spectrophotometric assays, DPPH, ABTS and TPC, to determine antioxidant activity of beer samples (n=3).

Sample	TPC ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH $\text{IC}_{50} \mu\text{L}$	ABTS $\text{IC}_{50} \mu\text{L}$	EI ($\mu\text{A/mV}$)
AB1	6.1 $\pm$ 1.2	15.5 $\pm$ 1.5	0.10 $\pm$ 0.02	5.6 $\pm$ 0.4
AB2	5.8 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 1.8	0.19 $\pm$ 0.04	2.0 $\pm$ 0.1
AB3	4.9 $\pm$ 0.9	17.7 $\pm$ 2.0	0.20 $\pm$ 0.04	2.9 $\pm$ 0.2
AB4	7.4 $\pm$ 1.1	8.6 $\pm$ 1.4	0.17 $\pm$ 0.04	2.7 $\pm$ 0.2
AB5	4.7 $\pm$ 0.7	14.8 $\pm$ 1.6	0.16 $\pm$ 0.03	3.0 $\pm$ 0.2
AB6	10.9 $\pm$ 1.2	7.5 $\pm$ 0.7	0.12 $\pm$ 0.02	3.3 $\pm$ 0.4
AB7	6.0 $\pm$ 0.9	23.1 $\pm$ 2.1	0.31 $\pm$ 0.05	3.9 $\pm$ 0.2
AB8	8.1 $\pm$ 1.0	19.6 $\pm$ 2.1	0.17 $\pm$ 0.03	4.0 $\pm$ 0.3
AB9	5.9 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 1.0	0.15 $\pm$ 0.03	2.1 $\pm$ 0.1
AB10	3.8 $\pm$ 0.6	24.1 $\pm$ 2.3	0.24 $\pm$ 0.04	3.4 $\pm$ 0.2
AB11	9.1 $\pm$ 1.0	7.7 $\pm$ 0.7	0.12 $\pm$ 0.02	3.4 $\pm$ 0.4
AB_{average}	6.6$\pm$0.9	15.0$\pm$1.6	0.18$\pm$0.03	3.3$\pm$0.2
LB1	3.8 $\pm$ 0.5	17.9 $\pm$ 2.0	0.31 $\pm$ 0.10	2.8 $\pm$ 0.2
LB2	4.0 $\pm$ 0.3	19.5 $\pm$ 1.5	0.35 $\pm$ 0.05	1.8 $\pm$ 0.3
LB3	4.0 $\pm$ 0.5	19.2 $\pm$ 1.7	0.30 $\pm$ 0.10	1.5 $\pm$ 0.2
LB4	3.9 $\pm$ 0.5	17.3 $\pm$ 1.4	0.31 $\pm$ 0.09	1.8 $\pm$ 0.2
LB5	3.8 $\pm$ 0.5	19.1 $\pm$ 0.9	0.32 $\pm$ 0.05	2.6 $\pm$ 0.4
LB6	4.0 $\pm$ 0.6	17.4 $\pm$ 1.8	0.27 $\pm$ 0.09	2.2 $\pm$ 0.3
LB7	4.7 $\pm$ 0.6	20.8 $\pm$ 2.0	0.30 $\pm$ 0.10	2.0 $\pm$ 0.3
LB8	4.3 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 2.0	0.28 $\pm$ 0.08	2.1 $\pm$ 0.2
LB9	4.5 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 1.5	0.31 $\pm$ 0.05	2.8 $\pm$ 0.3
LB10	5.7 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 1.0	0.12 $\pm$ 0.02	6.8 $\pm$ 0.5
LB11	5.0 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 2.0	0.25 $\pm$ 0.09	2.8 $\pm$ 0.3
LB_{Average}	4.3$\pm$0.5	17.9$\pm$1.6	0.28$\pm$0.07	2.7$\pm$0.3

The bold represents the average of each group of different type of beer samples

As can be seen, the IC_{50} values correlate negatively with EI and TPC values. Indeed, the smaller the amount required to reduce DPPH and ABTS radicals greater is the antioxidant power. It can be also observed that ale beers present higher AA than the lager group. This fact can be attributed to the higher fermentation temperature related to the brewing process of Ale beers, thus leading to higher

extraction of phenolics. In turn, the poor correlation between TPC and other AA methods is probably consequence of low selectivity of FC method. In fact, FC reagent is used to measure proteins and undergo reaction with reducing sugars, both classes present in beers (Escarpa & Gonzalez, 2001; Lino *et al.*, 2014, Oliveira-Neto *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2017).

According to the Pearson correlation matrix, the correlation between EI with TPC, DPPH and ABTS were 0.78, 0.82 and 0.89 respectively for the lager group, while for the ale group correlations were no statistically ($p>0.05$). Mainly due to interference from turbidness of the samples during spectrophotometric assays. This fact reiterates use of electrochemical methods, which can be applied to allow a better comprehension of the redox behavior of the antioxidant present in beer (Basnet *et al.*, 1996; Blasco *et al.*, 2007; Escarpa, 2012; Oliveira-Neto *et al.*, 2016).

Better understanding and grouping of data, multivariate analysis was performed. In the principal component analysis, Fig. 3, 78.80% of the information is explained in two axes, F1 e F2. Whereas 54.84% is explained by F1 and 23.96% by F2. Along F1 is possible to separate two groups. Where to positive values scores have group I, mainly formed by samples of lager group (LB). Already for negative scores there are groups II and III, being mainly dictated by EI, bitterness and TPC indicating an increase in antioxidant activity. And when we look over F2, the main separation is the group III, dictated by EI. Group III consists of the LB10, AB1 and AB6 samples, showing a higher antioxidant power.

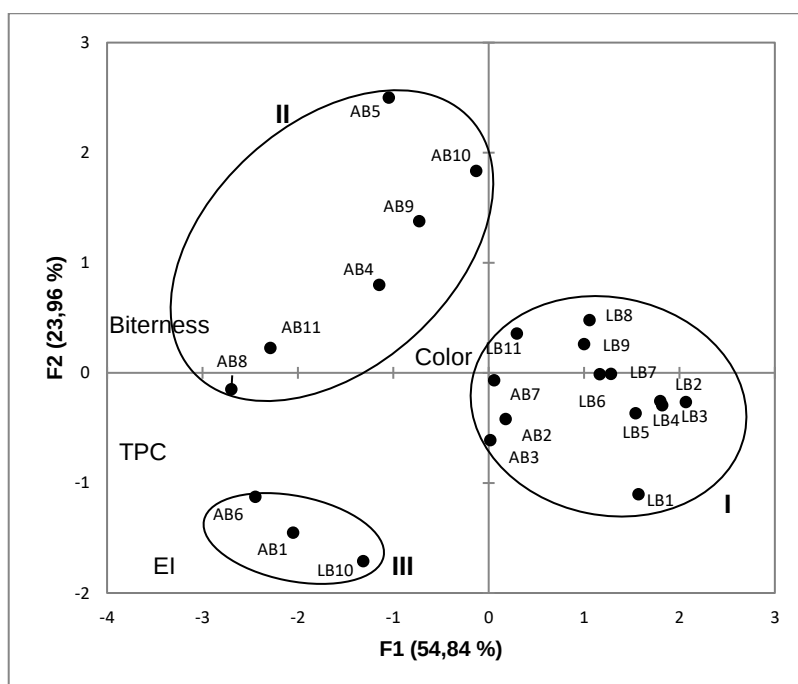


Fig. 3. The PCA biplot. Showing the three groups (I, II and III).

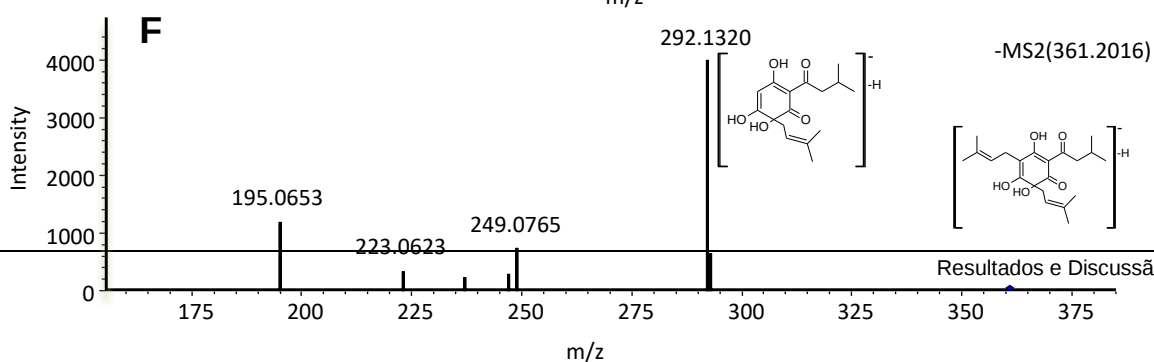
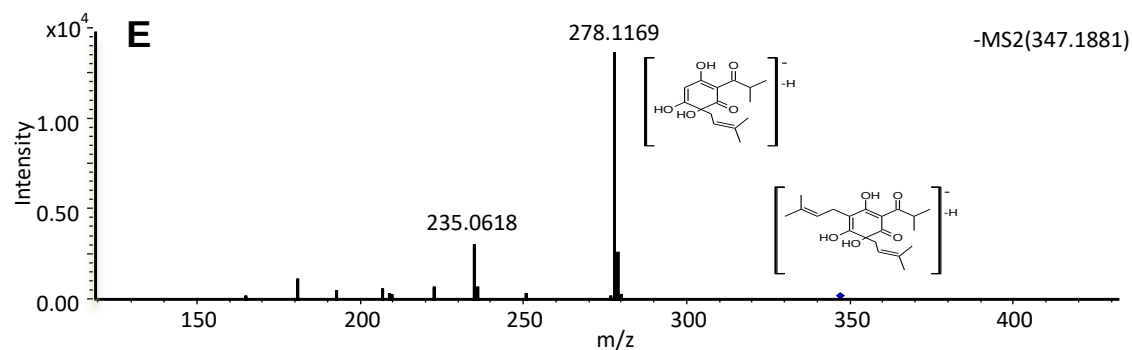
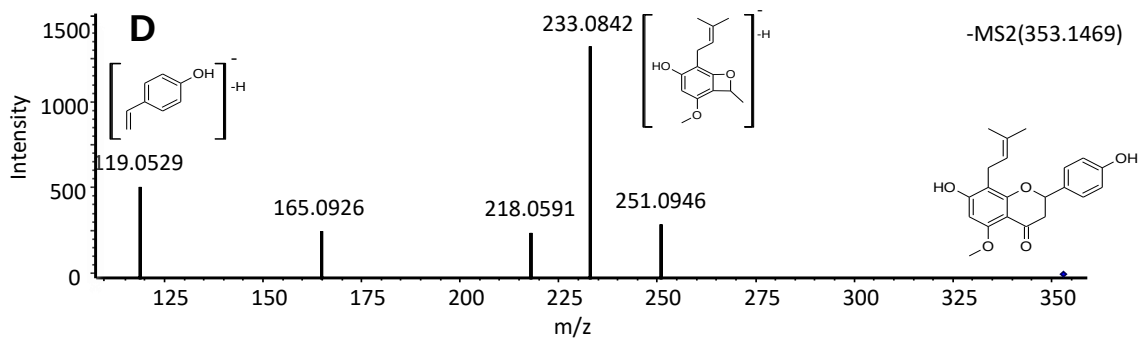
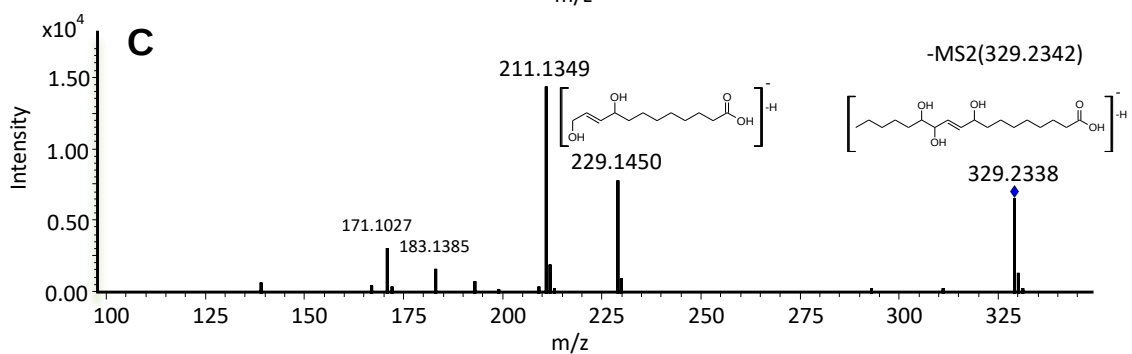
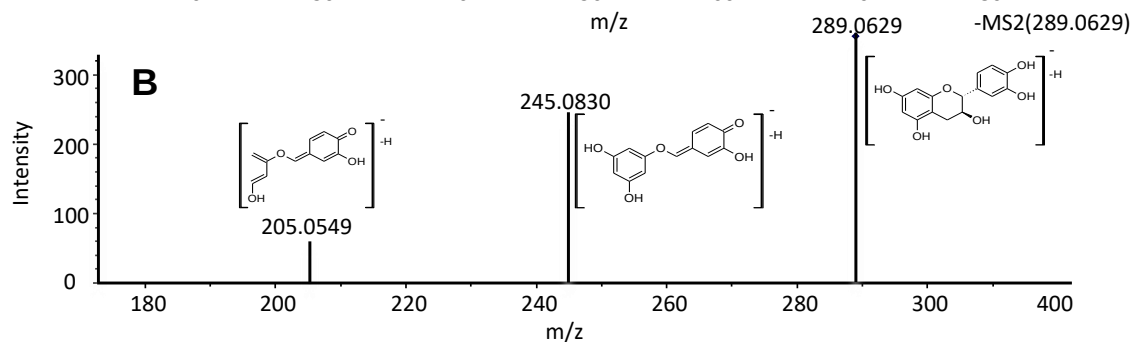
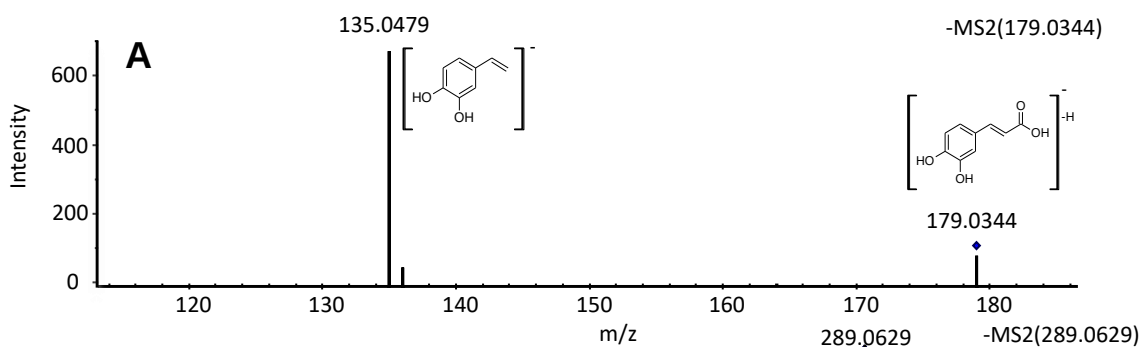
3.3. LC-QTOF Analysis

Important compounds have been identified, corroborating with recently data from literature (Quifar-Rada *et al.*, 2015; Moura-Nunes *et al.*, 2016). Moreover, such compounds are correlating to the antioxidant effects detected in the electrochemical method. The identified compounds are in table 3.

Table 3. Compounds identified in beer samples.

Compound	Accurate mass [M-H]	Fragment	Error mDa	Molecular Formula
Caffeic acid*	179.0344	135.0479	0.6	C ₉ H ₈ O ₄
Catechin*	289.0626	245.0830	8.6	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
		205.0549		
Trihydroxyoctadecenoic acid	329.2338	229.1450	0.5	C ₁₈ H ₃₄ O ₅
		211.1349		
Isoxanthohumol	353.1469	233.0842	7.5	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
		119.0529		
Cohumulone	347.1881	278.1169	2.3	C ₂₀ H ₂₈ O ₅
Humulone	361.2016	292.1320	1.0	C ₂₁ H ₃₀ O ₅

*Identified with reference standard



Supplementary Fig. S1. Mass spectrums of identified compounds (A) caffeic acid (B) catechin (C) trihydroxyoctadecenoic acid (D) isoxanthohumol (E) cohumulone (F) humulone.

The precursor ions were selected and then fragmented, of those identified only caffeic acid and catechin were confirmed with reference standard. The others were proposed by the fragmentation pattern and by the accurate mass. Here identification is possible due to the high resolution of the spectrometer used (QTOF) and that allows mass measure to four decimal places, thus reducing the possibilities. The mass spectra were shown in supplementary Fig. S1.

The substances identified appear to be only of natural source. Mainly from hops as isoxanthohumol, cohumulone and humulone. From barley, the compound of trihydroxyoctadecenoic acid (TOD) was identified. Which is derived from linoleic acid and is formed during the brewing process, principally in the malting. TOD is one of those responsible for flavor and microbiological stability, and proven fungal activity (Hamberg, 1991). Catechin and caffeic acid can be from both, hop or barley, and has proven great antioxidant power (Rice-Evans *et al.*, 1996; Gülçin, 2006). This fact evidences that the main source of the antioxidant activity of these beer samples comes from the raw material and not added.

3.4. Study of vascular reactivity

The beer samples with higher electrochemical index and TPC value, AB1, AB6 and LB10, were selected to proceed the study of vascular reactivity. Firstly, tests were performed using cumulative concentrations of the samples (10^{-4} to 10^{-2} g/mL) in the presence of intact endothelium (E^{+}). The LB10, AB1 and AB6 showed a maximum vasodilatory effect (E_{max}) of 92 ± 4 , 88 ± 3 and 79 ± 3 %, respectively (Fig. 4A). Considering the results obtained, the order of vascular relaxation was LB10 > AB1 > AB6 and they are in accordance with the antioxidant behavior of the samples analyzed by electrochemical methods. These results appear to be the firstly to display the vasorelaxant effect of beers and to correlate this action with antioxidant properties determined by electrochemical approaches.

On the other hand, the mass spectrometry technique identified polyphenols compounds in the beer samples, as caffeic acid, catechin, isoxanthohumol, cohumulone and humulone. The presence of the polyphenol compounds in the beer samples can be associated with the vasodilatory effect, and a polyphenol-rich daily

intake is linked with a protective effect on the cardiovascular system in humans and animals (Leblais *et al.*, 2008; Figard *et al.*, 2008; Luciano *et al.*, 2011; Sá *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2016). Considering these informations, should be possible to suggest that beers sample here studied have a beneficial effect on cardiovascular system. The vascular reactivity on thoracic aorta endothelium denuded showed a low vasorelaxant effect of beer samples (Fig 4B), suggesting the vascular effect is mainly endothelium dependent.

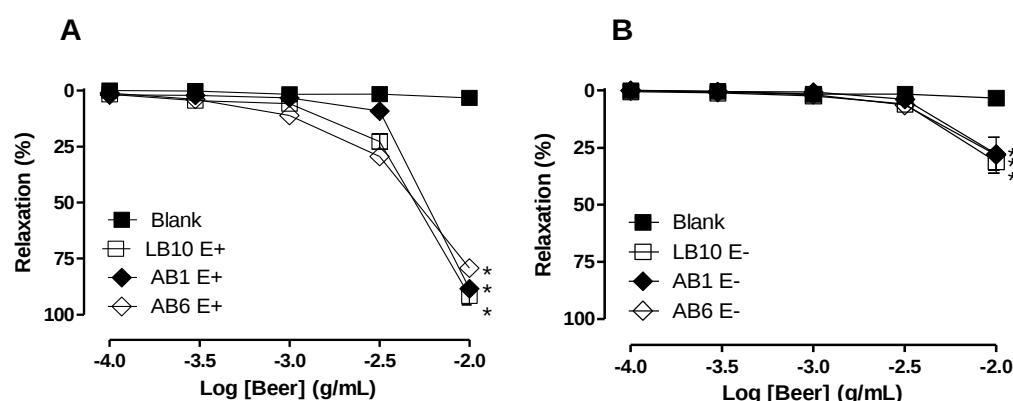
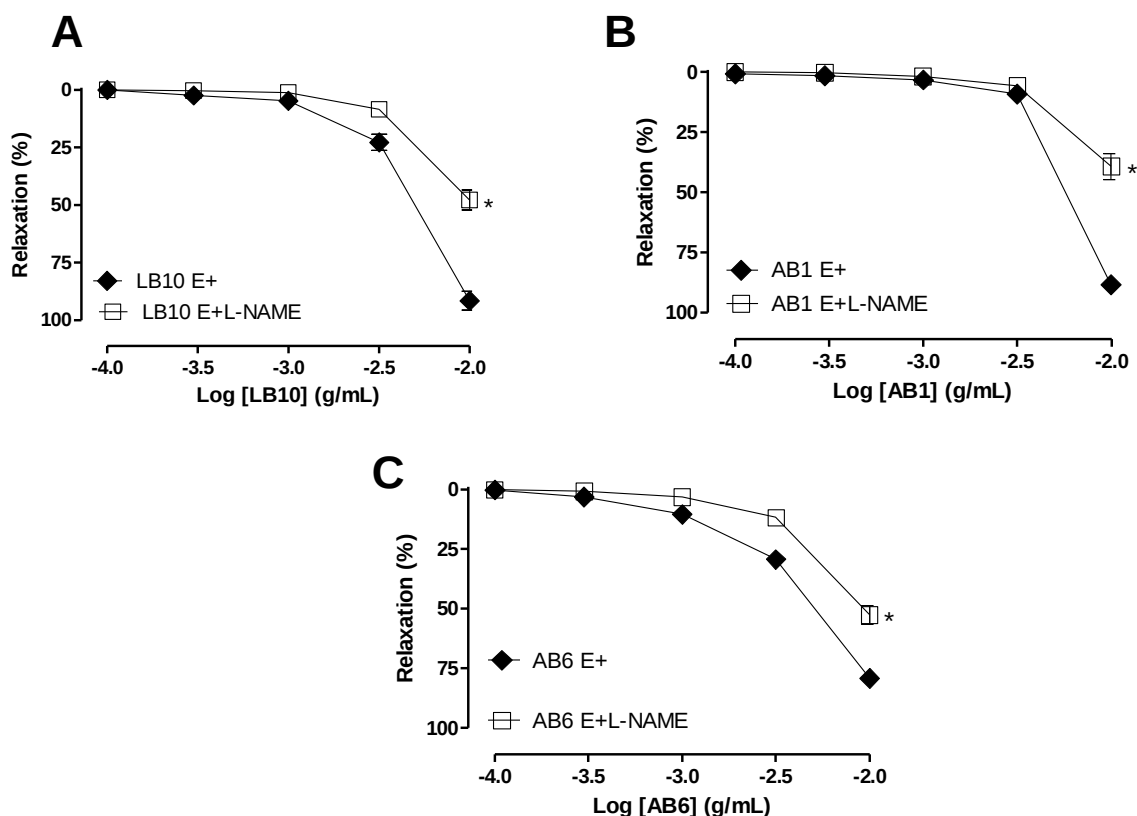


Fig. 4. Representative cumulative concentration-response curves tracing of LB10, AB1 and AB6 beer samples on aortic rings with- (A) or without- (B) endothelium pre-contracted with phenylephrine (1 μ M). Values are expressed as means $\pm$ SEM (n= 5-7 per sample). * P < 0.05 compared to the vehicle-treated group (ANOVA, Tukey post hoc test).

It is known that nitric oxide released by endothelial cells is a major vasodilator pathways. Nitric oxide is a compound that plays a crucial role in vasodilation via the relaxation of vascular smooth muscles (Zago & Zanesgo, 2006; Nemzer *et al.*, 2011). In this work, the inhibition of NO synthase with L-NAME altered significantly the relaxation of the beers tested, reducing about of 50% for LB10 and AB1, and 30% for AB6 of the maximum relaxation (see supplementary Fig. S2). Therefore, beers tested here produce relaxation by other mechanisms, different to NO liberate in the vessels. But, more experiments are needed that the mechanism by which these beverages induce relaxation can be clarified.



Supplementary Fig. S2. Representative cumulative concentration-response curves of LB10 (A), AB1 (B) and AB6 (C) beer samples on pre-contracted aortic rings in the presence of Nω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Values are expressed as means ± SEM (n= 5-7 per sample). * $P < 0.05$ compared to the vehicle-treated group (ANOVA, Tukey post hoc test).

3.5. Damage protection

3.5.1. Lipid peroxidation inhibition

May be observe the difference between the H₂O₂ and treated beer groups where measured decrease in thiobarbituric acid reacting substances formation. Therefore, protecting thereby against lipid peroxidation. LB10 sample (Fig. 5A) showed better response for this test. As the concentration of the sample is increased the levels of mda decrease proportionally. Furthermore, from 1 mg/mL the protection is statistically significant ($p < 0.05$) and reaches levels of the positive control, quercetin, at 10 mg/mL. While the samples AB1 and AB6, just have protect effects in this last concentration (data not showed).

3.5.2. Sensor Ade-CPE

ROS are known to damage DNA by oxidation of the bases, which results in their destruction. The lesions produced in the DNA seem to be related with several diseases, such as cancer (Evans & Cooke, 2004; Bursal & Gülçin, 2011). DNA sensors are promising devices to perform simple tests for the routine evaluation of the antioxidant capacity of samples in an easy way and low-cost analysis (Prieto-Simón *et al.*, 2008).

Once the peak current intensity is proportional to the adenine concentration, the immersion of the Ade-CPE into a hydrogen peroxide solution decreases the peak current intensity. The addition of beer sample, LB10, into the hydrogen peroxide solution results in the scavenging of the ROS. Consequently, after immersion of the electrode into this solution, the peak current intensity increase and tends to regenerate (Fig. 5B).

This behavior was related to the ability of antioxidant compounds to scavenge or inactivate the ROS and prevent the damage on DNA. Therefore, the number of lesions diminished, resulting in a greater number of available adenine to electrochemical oxidation. The results showed that the electrochemical method was attractive due to their sensibility, practicality, low cost, when compared with traditional methods, which demand large amounts of reagents, complicated and time-consuming procedures and still have disadvantages such as overestimation results (Mello *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2011a; Barroso *et al.*, 2011b).

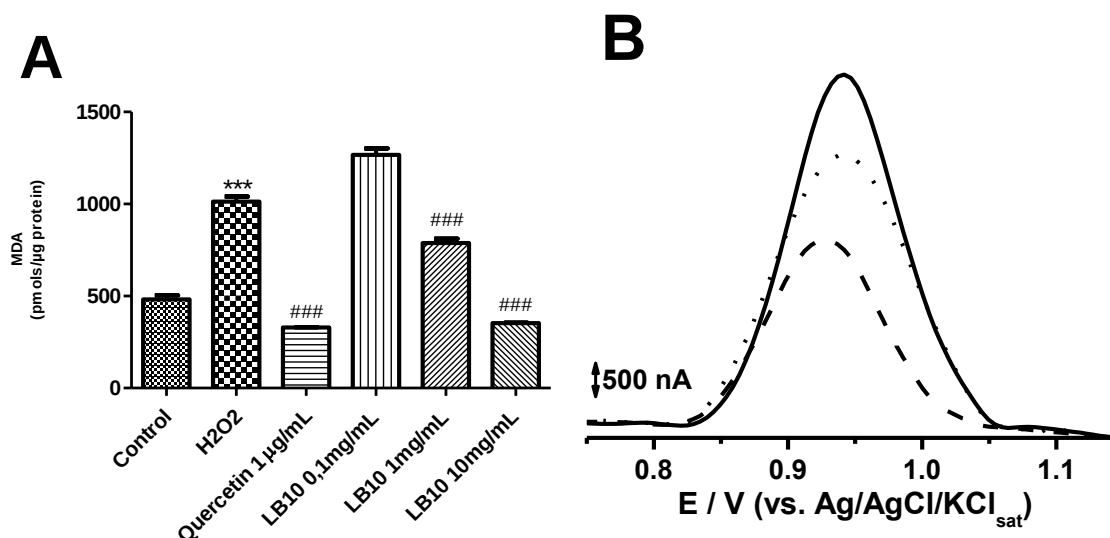


Fig. 5. (A) Malondialdehyde (MDA) levels from lipid peroxidation in rat brains, *** $P < 0.05$ when compared with control; ### $P < 0.05$ when compared with H₂O₂; (B) DPV voltammograms obtained for CPE-Ade. Blank signal (—); after Immersion in hydrogen peroxide (---); Immersion in LB10 in the presence of hydrogen peroxide (....).

4. Conclusions

The EI appears as a quick and suitable tool for evaluation the antioxidant properties of beer samples and showed a great correlation with radical scavenging assays. Another important finding was the correlation with vasodilatory effect and the antioxidant potential of beers, giving a novel additional value to electroanalytic approaches. Moreover, the study showed that beers may have a beneficial effect on cardiovascular system, expanding our knowledge about them, which might be helpful for further research on the health, sensory properties and quality parameters of this worldwide consumed beverage.

Acknowledgments

The authors wish to thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq/Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa de Goiás (FAPEG-GO) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal (Capes/Brazil) for financial support.

References

- Andrade, D. M. L., Borges, L. L., Torres, I. M. S., Conceição, E. C., Rocha, M. L. (2016). *Jabuticaba*-Induced Endothelium-Independent Vasodilating Effect on Isolated Arteries. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 107(3), 223-229.
- Araújo, F. B., Silva, P. H. A., Minim, V. P. R. (2003). Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 121-128.
- Barroso, M. F., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A.J., Delerue-Matos, C., Oliveira, M. B., & Tuñón-Blanco, P. (2011). DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages. *Biosensors & Bioelectronics*, 26, 2396-2401.
- Barroso, M. F., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A.J., Delerue-Matos, C., Oliveira, M. B., & Tuñón-Blanco, P. (2011). Electrocatalytic evaluation of DNA damage by superoxide radical for antioxidant capacity assessment. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 659, 43-49.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., & Namba, T. (1996). Four di-Ocaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, 1479-1484.
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511, 71-81.
- Blasco, A. J., Rogerio, M. C., González, M. C., & Escarpa, A. (2005). "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 539, 237-244.
- Blasco, A. J., Crevillén, A. G., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19, 2275-2286.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bobak, M., Skodova, Z., Marmot, M. (2000). Effect of beer drinking on risk of myocardial infarction: population based case-control study. *British Medical Journal*, 20, 1378-1379.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Bursal, E. & Gülçin, I. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44 (5), 1482-1489.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J., Kyle, J. A. M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Review*, 13, 79-106.
- Escarpa, A. & González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427, 119-127.
- Escarpa, A. (2012). Food electroanalysis: Sense and simplicity. *The Chemical Record*, 12, 72-91.
- Evans, M. D., Cooke, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, 26, 533-542.

- Fegredo, J. A., Meynell, R., Lai, A. K. H., Wong, M. C. Y., Martin, C. R., Wiseman, H., Preddy, V. R. (2009). The antioxidant capacity of beer: relationships between assays of antioxidant capacity, color and other alcoholic and non-alcoholic beverages. In: Preddy, V. R. (Eds.) *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 475-481). London. Elsevier Inc.
- Figard, H., Girard, C., Mougín, F., Demougeot, C. & Berthelot, A. (2008). Effects of aqueous hop (*Humulus Lupulus* L.) extract on vascular reactivity in rats: Mechanisms and influence of gender and hormonal status. *Phytomedicine*, 15, 185-193.
- Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41, 1941-1954.
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 76-80.
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents-An overview. *Archives of Toxicology*, 86 (3), 345-391.
- Hamberg, M. (1991). Trihydroxyoctadecenoic Acids in Beer: Qualitative and Quantitative Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1568-1572.
- Jandera, P. (2009). Methods for HPLC analysis of phenolics compounds and flavonoids in beer. In: Preddy, V. R. (Eds.) *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 1003-1014). London. Elsevier Inc.
- Kilmartin, P. A., & Hsu, C. F. (2003). Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82, 501.
- Leblais, V., Krisa, S., Valls, J., Courtois, A., Abdelouhab, S., Vila, A. M., Mérillon, J. M., & Muller, B. (2008). Relaxation induced by red wine polyphenolic compounds in rat pulmonary arteries: lack of inhibition by NO-synthase inhibitor. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 22(1), 25-35.
- Lino, F. M. A., Sá, L. Z., Torres, I. M. S., Rocha, M. L., Dinis, T. C. P., Ghedini, P. C., Somersetc, V. S., Gil, E. S. (2014). Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochimica Acta*, 128, 25-31.
- Liu, F., Ng, T.B. (2000). Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences*, 66(8), 725-735.
- Luciano, M. N., Ribeiro, T. P., França-Silva, M. S., Nascimento, R. J. B., Oliveira, E. J., França, K. C., Antunes, A. A., Nakao, L. S., Aita, C. A. M., Braga, V. A., & Medeiros, I. A. (2011). Uncovering the vasorelaxant effect induced by Vale do São Francisco red wine: a role for nitric oxide. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57, 696-701.
- Macedo, I. Y. L., Garcia, L. F., Oliveira-Neto, J. R., Leite, K. C. S., Ferreira, V. S., Ghedini, P. C., Gil, E. S. (2017). Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. *Food Chemistry*, 217, 326-331.
- Mello, L. D., Hernandez, S., Marrazza, G., Mascini, M., & Kubota, L. T. (2006). Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 1374-1382.
- Moura-Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D., Aguiar, P. F., Monteiro, M., Perrone, D., Torres, A. G. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 199, 105-113.

- Nelson, M. (2005). *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. New York: Routledge.
- Nemzer, B. V., Rodriguez, L. C., Hammond, L., Di Silvestro, R., Hunter, J. M., Pietrzkowski, Z. (2011). Acute reduction of serum 8-iso-PGF₂-α and advanced oxidation protein products in vivo by a polyphenol-rich beverage, a pilot clinical study with phytochemical and in vitro antioxidant characterization. *Nutritional Journal*, 10(1), 1-11.
- Oliveira, L. M., Oliveira, T. S., Costa, R. M., Gil, E. S., Costa, E. A., Passaglia, R. C. A. T., Filgueira, F. P., Ghedini, P. C. (2016). The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Vascular Pharmacology*, 81, 69-74.
- Oliveira-Neto, J. R., Rezende, S. G., Reis, C. de F., Benjamin, S. R., Rocha, M. L., & Gil, E. S. (2016). Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, 506-512.
- Onâte-Jaén, A., Bellido-Milla, D., Hernández, A. (2006). Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food chemistry*, 97, 361-369.
- Pavsler, A., Buiatti, S. (2009). Non-Lager Beer. In: Preddy, V. R. (Eds.) *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 17-30). London. Elsevier Inc.
- Philpott, J., Taylor, D. M., Williams, D. R. (1997). Critical assessment of factors affecting the accuracy of the IoB Bitterness Method. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 55 (3), 103-106.
- Prieto-Simón, B., Cortina, M., Campàs, M., Calas-Blanchard, C. (2008). Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sensors and Actuators B*, 129, 459-466.
- Quiñer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 169, 336-343.
- Reis, N. S., Serrano, S. H. P., Meneghatti, R. And Gil, E. S. (2009). Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28, 949-953.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids And Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
- Rufino, M. S. M. et al. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. *Comunicado técnico on line*, Embrapa ISSN 1679-6535.
- Sá, L. Z. C. M., Castro, P. F. S., Lino, F. M. A., Bernardes, M. J. C., Viegas, J. C. J., Dinis, T. C. P., Santana, M. J., Romão, W., Vaz, B. G., Lião, L. M., Ghedini, P. C., Rocha, M. L., Gil, E. S. (2014). Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). *Journal of Functional Foods*, 8, 169-179.
- Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S. D., & Kumar, V. (2005). A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *Journal Food Composition Analysis*, 18, 583-594.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Sousa, C. M. M. *et al.* (2007). Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.
- Tipos de Cerveja. (2016). <http://www.sindicerv.com.br/tipo- cerveja.php>>. Accessed 10.07.16.
- Tipos de Cerveja. (2016). <http://www.cervesia.com.br/tipos-de-cerveja.html>>. Accessed 10.07.16.
- Wunderlich, S., Back, W. (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In: Preddy, V. R. (Eds.) *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 3-16). London. Elsevier Inc.
- Zago, A. S. & Zanesco, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. (2006). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87(6), e264-e270.

Antioxidant capacity and total phenol content in hop and malt commercial samples

Jerônimo Raimundo Oliveira Neto^{a,*}, Isaac Yves Lopes de Macêdo^a, Naiara Raica Lopes de Oliveira^a, Rafael de Queiroz Ferreira^b, Eric de Souza Gil^a.

^a*Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO - 74605-220, Brazil*

^b*Chemistry Department, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES -29060-900, Brazil*

jeronimoneto8@gmail.com

Abstract

The antioxidant properties of commercial hops and malted barley were evaluated by electroanalytical methods and compared with spectrophotometric methods. Hop group showed better antioxidant capacity and total phenols content (TPC) values than malt group. The highest electrochemical Index (EI) was observed for HCO hop sample. Electrochemical Index (EI) showed a good Pearson correlation with ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and TPC, being of 0.85, 0.77 and 0.86 respectively for hop samples. While for the malt samples were 0.96, 0.69 and 0.49, respectively. The samples were compared to each other within each group and statistical differences can be observed, $p < 0.05$. Therefore, the electroanalytical tools showed to be practical and easy to evaluate the antioxidant properties of hop and malt samples. The results may contribute to the selection of raw material for brewing and therefore with the quality of one of beverage one most consumed around the world.

Keywords: antioxidants, electrochemical index, hop, malt, voltammetry.

1. Introduction

According to the historical German Law “Das Reinheitsgebot”, the beers must be brewed by using only barley, hops, and water [1]. Though other cereal grains, *i.e.* rice, corn and wheat are allowed in some countries as basic substrate for brewing, the malted barley is the most traditional and frequently used [2]. In turn, the hop, the second most relevant ingredient, has flavoring and stabilizing functions, which are related to its phenolic content [3,4].

In fact, several phenolic compounds have been identified in hops, barley, and beers [5-7]. Phenolic acids, proanthocyanidins and flavonoids are examples of phenolic compounds that were identified in such major beer ingredients [8].

The polyphenols are responsible for flavor and bitterness in beers and also have some minor contribution to their color. Moreover, beer polyphenols are crucial to the physicochemical stability of the foam [4,9-12]. Moreover, phenolic compounds prevent and delay the oxidation processes enhancing the shelf life of beers [13]. In turn, polyphenols rich food intake is strongly connected to healthiness [14-18]. Therefore, the determination of total phenol content and antioxidant activity is an important attribute of beer quality, and may begin in the quality of barley and hops, which are its main raw ingredients.

Antioxidant capacity can be determined by various spectrophotometric assays, such as ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assays, that are traditional and consolidated methods [19,20]. These methods have as principle the discoloration of the solution by electron and hydrogen transfer mechanism. Nevertheless, in complex matrices, there are many compounds that can absorb in the same wavelength range, affecting directly the reliability of the results [21]. In addition, there have been reports of pH interferences in the reliability of the results [22]. In the same hand, the method to determine total phenols contents (TPC) by Folin-Ciocalteu (FC), can induce overestimation in the results due to low selectivity of the FC reagent [21,23-25].

Oxidation reactions are constantly present in biological oxidation processes and these processes being perfectly described by the charge transport. Therefore, electrochemical monitoring can be used to obtain a detailed description of the phenomenon of electron transfer and, additionally, kinetic data can be recorded. The link between the redox properties of the antioxidant compounds and the efficacy of

their '*in vitro*' action is, therefore, fundamental in determining the antioxidant capacity [26].

In this perspective, electrochemical techniques began to be used in the determination of the antioxidant capacity from 1997, with the pioneering work of Chevion *et al.*, Who used cyclic voltammetry to evaluate the power of reduction of low molecular weight antioxidants (ABPM) present in samples of biological fluids and human tissues [27].

Nowadays, several methodologies, which employ the most diverse electrochemical techniques, are used in the determination of the total antioxidant capacity, among which, we can highlight the cyclic voltammetry [27] already mentioned, besides others, such as: differential pulse voltammetry [28], square wave voltammetry [29,30] and amperometry [31,32].

Thereby, the electrochemical methods come as alternatives and show advantages such as quickness, sensitivity and low consumption of sample and reagent [33,34]. Electroanalysis is able to provide important information to trace the redox profile of crude and complex samples. This allows inferences about specific antioxidant classes [24,35,36].

Indeed, the electrochemical index (EI) concept have already proved to express successfully the antioxidant capacity of complex matrices such as wine [34,37], coffee [25], red fruits extracts [38], and beer [12]. Therefore, the aim of this work was to investigate and correlate phenolic profiles and antioxidant activities of hops and malted barley using electroanalytical approaches.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Ethanol, potassium phosphate, sodium carbonate and potassium persulfate were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), all analytical grade. ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid (GA), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All electrolyte solutions were prepared using Milli-Q water (conductivity $\leq 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Millipore®, Molsheim, France).

2.2. Samples

Hops (Barth-Haas, Columbus, Cascade and Hallertau) and malted samples (Chateau Cristal, Chateau Munich, Pilsen, and Wheat) acquired from different countries were studied. Table 1 shows the names, codes, and origin.

All samples were extracted with hot water, 60 °C during 30 min. This is not one of the most used extraction methods, however the aim was to simulate the heating of the brewing process. Hops extract were prepared at 1% (w/v), while malt barley extracts at 40% (w/v), this difference in concentration was employed to increase the malt analytical response and to simulate the brewing process again, where a greater quantity of malted barley than hops are used. These extracts were used for all the assays.

Table 1. Identification of hops and malt samples analyzed in this study.

Sample	Code	Origin
Hops		
<i>Barth-Hass</i>	HBH	Germany
<i>Cascade</i>	HCA	USA
<i>Columbus</i>	HCO	USA
<i>Harllateau</i>	HHA	Germany
Malt		
<i>Chateau</i>	MCC	Belgian
<i>Cristal</i>		
<i>Chateau</i>	MCM	Belgian
<i>Munich</i>		
<i>Pilsen</i>	MP	Argentin
<i>Wheat</i>	MW	Belgian

2.3. Spectrophotometric assays

The absorbance measurements were recorded with a spectrometer Q798U2VS (Quimis®, São Paulo, Brazil). All samples were analyzed in a glassy cell of a 1 cm at room temperature, 25±2 °C.

2.3.1. DPPH

The radical scavenging activity assays were performed using the stable DPPH reagent, in accordance with very well-established procedures [39]. In summary, the

initial control was constituted by a mixture 2.7 mL of DPPH ethanolic solution ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and 0.3 mL of ethanol, in which the absorbance (A) at 517 nm was near of 0.7. The ethanol was used to adjust the blank ($A = 0.000$). Antioxidant capacity was expressed as IC₅₀, representing the amount (L) of sample solution to produce 50% of discoloration of DPPH relative to the initial control solution. All samples were analyzed after five minutes reaction at room temperature.

2.3.2. ABTS

The radical scavenging activity assays were executed using the stable ABTS reagent, in accordance with very well-established procedures [40]. ABTS radical (ABTS^{•+}) was prepared by mixing 5 mL of the ABTS solution ($7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) with 88 μL of potassium persulfate ($140 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). The reaction was kept at room temperature in the dark during 16 h. The initial control solution was prepared by diluting the radical with ethanol until the absorbance reached values close to 0.70 at 734 nm. The sample was performed with the addition of 25 μL of sample in 3.0 mL of ABTS^{•+}, the reaction was kept at room temperature, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, by 5 min before measurement. Antioxidant activity was expressed as IC₅₀, representing the amount (L) of sample solution to produce 50% of discoloration of ABTS^{•+} relative to the blank control.

2.3.3. Folin-Ciocalteu assays

Total phenolic content was determined through the adapted Folin-Ciocalteu [41]. Briefly, 100 μL of the sample or gallic acid standard solution were added into 10 mL volumetric flask containing 2.0 mL of water, 0.5 mL of FC reagent and 1.5 mL of 20% Na_2CO_3 solution. The reaction was kept at room temperature in the dark during 1 h. Finally, the solution was measured 765 nm against a blank. All determinations were performed in triplicate and compared to the standard curve, to allow to express the results by means of gallic acid equivalents (GAE).

2.4. Electroanalytical assays

Voltammetric experiments were performed with a potentiostat/galvanostat $\mu\text{Autolab III}^{\text{®}}$ controlled by the GPES 4.9[®] software, (Utrecht, Netherlands). The measurements were achieved with a three-electrode system consisting of a carbon paste electrode, a Pt wire, and Ag/AgCl/ $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ (0.22 V vs SHE), representing working electrode, counter electrode, and reference electrode, respectively. For

cyclic voltammetry (CV): scan rate of 100 mV s⁻¹ and scan range from 0 to 1 V; For square wave voltammetry (SWV): pulse amplitude 50 mV, frequency 50 Hz and a potential increment of 2 mV, corresponding to an effective scan rate of 100 mV s⁻¹; and for differential pulse voltammetry (DPV): pulse amplitude 50 mV, pulse width 0.5 s and scan rate 10 mV s⁻¹. Differential pulse voltammograms were baseline-corrected, in the GPES software.

All experiments were performed at room temperature in triplicate using a 1.0 mL one-compartment electrochemical cell, containing electrolyte solution of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS), pH 5.0.

2.4.1. Electrochemical Index

To calculate the electrochemical index, the equation 1 was used. Where peak current (I_{pa}) is a kinetic parameter, correlated with the quantity of electroactive species, and peak potential (E_{pa}), is thermodynamic parameter, related to the higher capacity to donate electrons [34,35,37].

$$EI = \frac{I_{pa1}}{E_{pa1}} + \frac{I_{pa2}}{E_{pa2}} + \dots + \frac{I_{pan}}{E_{pan}} \quad (1)$$

2.5. Statistical Analysis

Data was expressed as mean $\pm$ standard deviation. Pearson's correlation matrix between different assays was performed. Analysis of variance (one-way ANOVA) followed by post hoc tests (Tukey) were used to compare samples group into different assays. Differences were considered significant when $p < 0.05$. These statistical analyses were performed using Origin[®] and Graphpad prism[®].

3. Results and discussions

3.1. Electrochemical characterization of hops and barley samples

From preliminary studies, it was found a great discrepancy between the content of electroactive species of hops and barley samples. For instance, even for a forty times more concentrated solution, the resulting peak currents obtained for barley samples were less than a quarter of that one obtained for hops (Fig. 1).

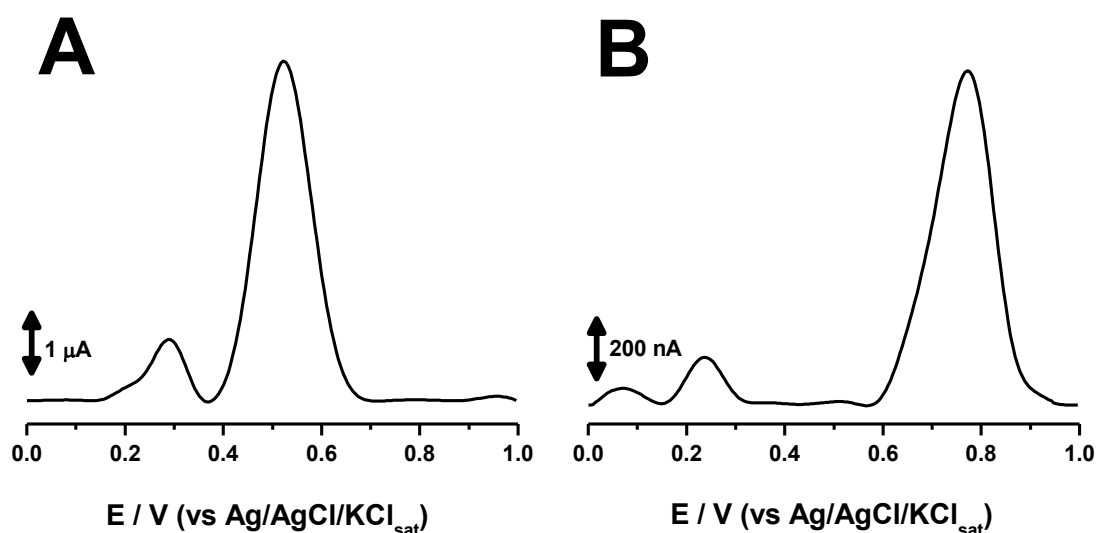


Fig. 1. Differential pulse voltammograms obtained in 0.1 mol L⁻¹ Phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode; **A)** for hops sample extract 1% (w,v) and **B)** for malted barley extract 40% (w,v).

In this sense, the redox behavior of hop samples was evaluated by different voltammetric techniques. Fig. 2A shows a typical cyclic voltammogram obtained for Columbus hop sample in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 5.0, in which can be observed two anodic peaks 1a and 2a, at $E_{p1a} = 0.35$ V and $E_{p2a} = 0.61$ V, respectively. On the reverse scan, it was not possible to observe any cathodic peaks, which can be attributed to an adsorptive behavior, as evidenced by the expressive fall of peak current values on successive scans.

The suppression of peak currents is typical of the electrooxidation of phenolic species, followed by formation of insulating film at electrode surface. Applying DPV, in which the capacitive currents are minimized, it was possible to identify the same anodic peaks, but with higher resolution (Fig. 2B).

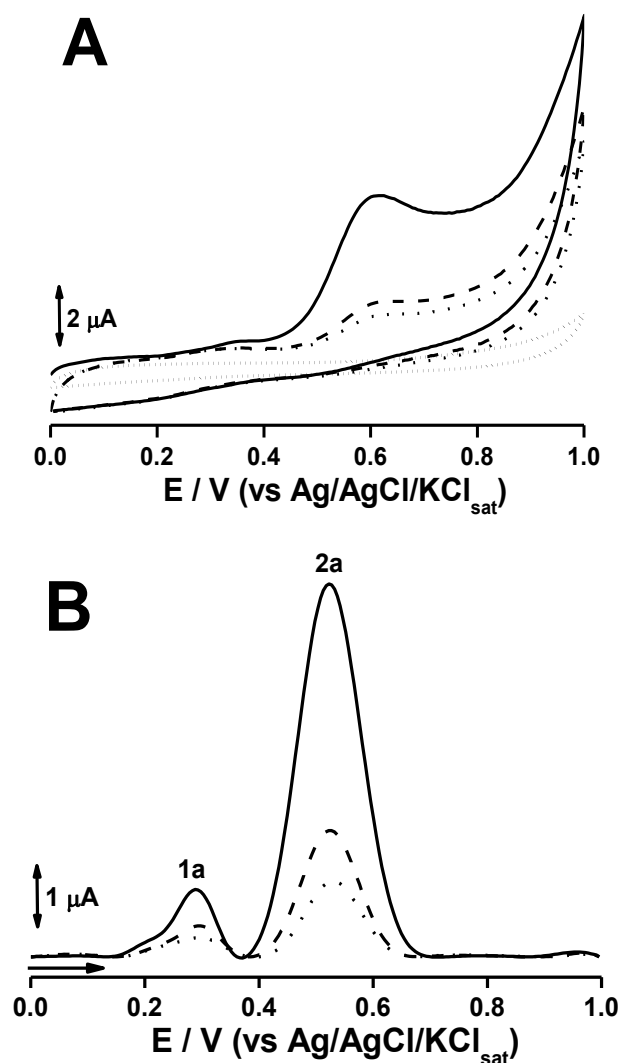


Fig. 2. A) First (—), second (---) and third (···) successive CV scans for HCO sample. Scan rate of 100 mV s^{-1} . **B)** First (—), second (---) and third (···) successive DPV scans for HCO sample. Pulse amplitude of 50 mV , pulse width of 5 mV , scan rate of 10 mV s^{-1} . Obtained in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode.

The effect of pH was evaluated by DPV, and where the best intensity and resolution peak current was reached at pH 5.0, thereby, this condition was utilized for further assays. The slope value of the linearity of plot E_{pa} vs pH , Fig. 3B, reached was close to the Nernstian theoretical value of 59 mV/pH unit, indicating the contribution of an equal number of electrons and protons in the redox process [42].

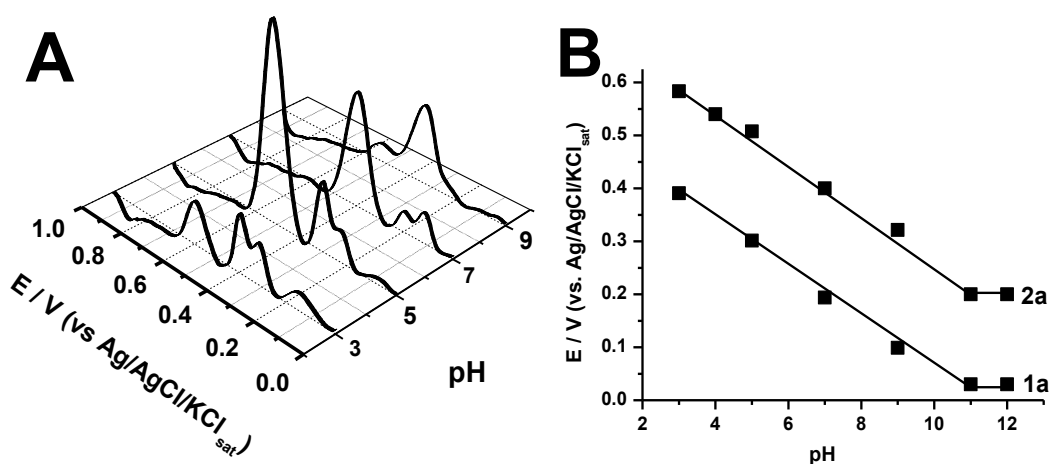


Fig. 3. **A)** 3D plots of differential pulse voltammograms baseline corrected for Columbus hop sample in different pH conditions. **B)** E_{pa} vs pH plot. Pulse amplitude of 50 mV, pulse width of 5 mV, scan rate of 10 mV s⁻¹.

In turn, the reversibility of redox pair 1a and 1c was confirmed by plotting the SWV and its components, forward and backward current (Fig. 4), in which the anodic and cathodic pulses are applied almost simultaneously, avoiding insulating effects on further redox processes. Moreover, SWV is faster and more sensible than CV, whereas in case of reversible systems the sensitivity increases allowing detection of unstable oxidation products at low concentrations.

Already the second anodic peak, 2a, showed to be irreversible in all techniques applied. Similar voltammetric profile was obtained for other hops samples, herein evaluated.

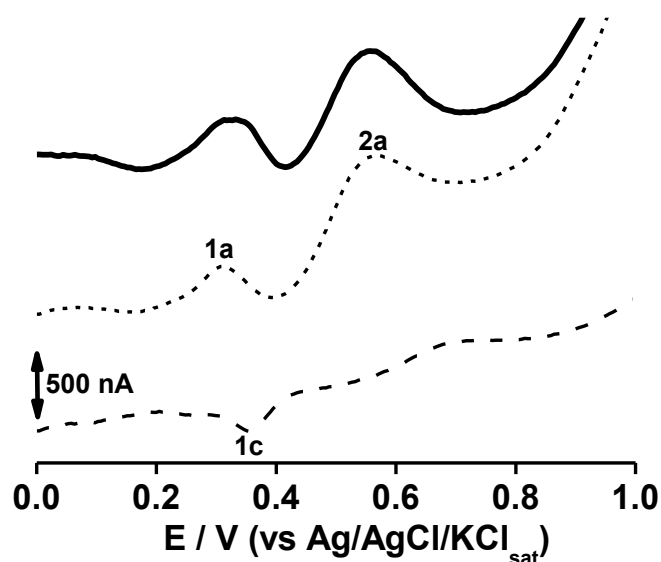


Fig. 4. SW voltammograms for HCO hop sample obtained in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 5.0 at carbon paste electrode. Pulse amplitude of 50 mV, frequency of 22 Hz, effective scan rate of 90 mV s⁻¹.

The DPV were performed in order to calculate the electrochemical index for the antioxidant activity [12,34,43].

3.2. Antioxidant Activity Determinations

The antioxidant activity (AA) of hop and malt samples was analyzed by spectrophotometric and electroanalytical methods and the results are showed on Table 2. Through radical scavenging assays were obtained the quantity of extract sample enough to reduce 50% of initial absorbance value, exhibited as IC₅₀ (μL), and the TPC was calculate as gallic acid equivalent (μg mL⁻¹ of extract), and EI (μA mV⁻¹), the sum of all I_{pa}/E_{pa} , as described in equation 1.

Table 2. Electrochemical index and spectrophotometric assays, DPPH, ABTS and TPC, to determine antioxidant activity of hops and malt samples (n = 3).

Sample	TPC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPPH IC ₅₀ (μL)	ABTS IC ₅₀ μL	EI ($\mu\text{A mV}^{-1}$)
Hops				
HBH	2.56 $\pm$ 0.07 ^a	29.51 $\pm$ 0.55 ^a	0.69 $\pm$ 0.05 ^a	1.68 $\pm$ 0.16 ^a
HCA	2.80 $\pm$ 0.20 ^a	10.91 $\pm$ 0.18 ^b	0.34 $\pm$ 0.02 ^b	4.88 $\pm$ 0.11 ^b
HCO	3.61 $\pm$ 0.08 ^b	11.48 $\pm$ 0.26 ^b	0.29 $\pm$ 0.02 ^b	8.66 $\pm$ 0.73 ^c
HHA	2.58 $\pm$ 0.16 ^a	12.02 $\pm$ 0.14 ^b	0.36 $\pm$ 0.03 ^b	4.85 $\pm$ 0.06 ^b
Hop_{average}	2.89$\pm$0.49	15.98$\pm$9.03	0.42$\pm$0.18	5.02$\pm$2.86
Malt				
MCC	1.80 $\pm$ 0.02 ^e	26.50 $\pm$ 0.10 ^e	0.57 $\pm$ 0.05 ^e	0.87 $\pm$ 0.02 ^e
MCM	1.03 $\pm$ 0.00 ^f	58.28 $\pm$ 0.05 ^f	1.55 $\pm$ 0.03 ^f	1.21 $\pm$ 0.01 ^f
MP	0.91 $\pm$ 0.00 ^g	39.59 $\pm$ 0.11 ^g	1.35 $\pm$ 0.03 ^g	1.81 $\pm$ 0.03 ^g
MW	0.93 $\pm$ 0.00 ^g	46.90 $\pm$ 0.09 ^h	0.82 $\pm$ 0.04 ^h	1.78 $\pm$ 0.12 ^e
Malt_{average}	1.17$\pm$0.42	42.82$\pm$13.32	1.07$\pm$0.46	1.42$\pm$0.46

The same letter in column indicate no statistical difference ($p > 0.05$). The bold represents the average of each group samples.

As can be observed in table 2, the EI values correlate positively with TPC, while IC₅₀ values has a negative correlation with both, EI and TPC. Really, as lower the quantity sample needed to reduce ABTS and DPPH radicals higher is the antioxidant activity [12,25,38]. Per the Pearson correlation matrix, the correlation between EI with, ABTS, DPPH and TPC were 0.85, 0.77 and 0.86 respectively for the hop sample. While for the malt samples were 0.96, 0.69 and 0.49, respectively. All correlations were statistically significant ($p < 0.05$). These correlations corroborate to the use of electroanalytic tools, which can be applied to aim a better knowledge of the redox profile of antioxidant contained in complexes matrices, agreeing with data already reported in literature [21,24,25,43].

Hops samples group showed greater antioxidant power, in all assays, when compared to the malted barley samples group at a significance level of 95% ($p < 0.05$). Inside the hop samples group AA order was HCO>HCA>HHA>HBA, already the malt sample group was MP>MW>MCM>MCC. The samples were compared to each other within each group using ANOVA followed by post hoc tests (Tukey) and statistical differences can be observed, $p < 0.05$, Table 2.

4. Conclusions

In this work a new electroanalytical tool, the electrochemical index, was employed to evaluate the antioxidant activity of hops and malt samples. The good correlation of this electrochemical tool with radical scavenging and TPC profile assays, besides its quickness and sensitivity, demonstrate EI adequacy to express the antioxidant power. The extracts were statistically different from each other, which may contribute greatly to choose the raw material for brewing and therefore with the quality assessment of one of most consumed beverages around the world.

Acknowledgments

The authors wish to thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa de Goiás (FAPEG-GO) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal (Capes/Brazil) for financial support.

References

- [1] BGB1. Teil 1 Das vorläufiges Biersteuergesetz von, **1993**, 29, 1399.
- [2] BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 de setembro de 1997.
- [3] P. Fantozzi, L. Montanari, F. Mancini, A. Gasbarrini, G. Addolorato, M. Simoncini, M. Cardini, A. Ghiselli, C. Scaccini, *Lebensm. Wiss. Technol.* **1998**, 31, 221.
- [4] A. Mikyska, M. Hrabak, D. Haskova, J. Srogl, *J. Inst. Brew.* **2002**, 108, 78.
- [5] J.F. Stevens, M. Ivancic, V.L. Hsu, M.L. Deinzer, *Phytochem.* **1997**, 44, 1575.
- [6] J. Stevens, C. Miranda, D.R. Buhler, *J. Am. Soc Brew Chem.* **1998**, 56, 136.
- [7] J.F. Stevens, A.W. Taylor, M.L. Deinzer, *J. Chromatogr. A* **1999**, 832, 97.
- [8] M. Bonoli, V. Verardo, E. Marconi, M.F. Caboni, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5195.
- [9] S. Gorinstein, A. Caspi, I. Libman, H. Leontowicz, M. Leontowicz, Z. Tashma, E. Katrich, Z. Jastrzebski, S. Trakhtenberg, *Int. J. Food Sci Nutr.* **2007**, 58, 94.
- [10] S.Z. Gorjanovic, M. Novarkovic, N.I. Potkonjak, I. Leskosek-Chkalovic, D.Z. Suznjevic, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 744.
- [11] N. Moura-Nunes, T.C. Brito, N.D. Fonseca, P.F. Aguiar, M. Monteiro, D. Perrone, A.G. Torres, *Food Chem.* **2016**, 199, 105.
- [12] J.R. Oliveira-Neto, T.S. Oliveira, P.C. Ghedini, B.G. Vaz, E.S. Gil, *J. Funct Foods* **2017**, 34, 130.
- [13] M. Karabín, P. Dostálek, P. Hofta, *Chem. Listy* **2006**, 100, 184.
- [14] C. Gerhäuser, *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 1941.
- [15] C.M.M. Sousa et al., *Quím. Nova* **2007**, 30, 351.
- [16] P. Jandera, in *Beer in Health and Disease Prevention* (Eds: V.R. Preddy), Elsevier Inc., London, **2009**, pp. 1003-1014.
- [17] V.R. Preddy, *Beer in Health and Disease Prevention*, Academic Press Publisher, New York, **2009**.
- [18] H. Zhao, W. Chen, J. Lu, M. Zhao, *Food Chem.* **2010**, 119, 1150.

- [19] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, D. Hawkins Byrne, *J. Food Comp. Anal.* **2006**, 19, 669.
- [20] A. Floegel, D. Kim, S. Chung, S.I. Koo, O.K. Chun, *J. Food Comp. Anal.* **2011**, 24, 1043.
- [21] P. Basnet, K. Matsushige, K. Hase, S. Kadota, *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19, 1479.
- [22] M. Ferri, A. Gianotti, A. Tassoni, *J. Food Comp. Anal.* **2013**, 30, 94.
- [23] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, *Methods in Enzymol.* **1999**, 299, 152.
- [24] A.J. Blasco, A.G. Crevillén, M.C. González, A. Escarpa, *Electroanal.* **2007**, 19, 2275.
- [25] J.R. Oliveira-Neto, S.G. Rezende, C.F. Reis, S.R. Benjamin, M.L. Rocha, E.S. Gil, *Food Chem.* **2016**, 190, 506.
- [26] J. Sochor, J. Dobes, O. Krystofova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, M. Pohanka, T. Jurikova, O. Zitka, V. Adam, B. Klejdus, R. Kizek, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8, 8464.
- [27] S. Chevion, E. M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, *Free Radical Bio. Med.* **1997**, 22, 411.
- [28] D. Baval, H. Dejmekova, M. Scampicchio, J. Zima, J. Barek, *Electroanal.* **2017**, 29, 182.
- [29] R. Armellini, D. Compagnone, M. Scampicchio, P. Pittia, *Electroanal.* **2017**, 29, 521.
- [30] S. M. Lemma, M. Scampicchio, A. Bulbarelo, M. Mason, L. Schweikert, *Electroanal.* **2014**, 26, 1582.
- [31] R. Q. Ferreira, L. A. Avaca, *Electroanal.* **2008**, 20, 1323.
- [32] R. Q. Ferreira, S. J. Greco, M. Dermelina, K. C. Weber, *Electrochim. Acta* **2015**, 163, 161.
- [33] P.A. Kilmartin, C.F. Hsu, *Food Chem.* **2003**, 82, 501.
- [34] F.M.A. Lino, L.Z. Sá, I.M.S. Torres, M.L. Rocha, T.C.P. Dinis, P.C. Ghedini, V.S. Somersetc, E.S. Gil, *Electrochim. Acta* **2014**, 128, 25.
- [35] A.J. Blasco, M.C. González, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta.* **2004**, 511, 71.
- [36] N.S. Reis, S.H.P. Serrano, R. Meneghatti, E.S. Gil, *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, 28, 949.
- [37] A.J. Blasco, M.C. González, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta.* **2005**, 539, 237.
- [38] I.Y.L. Macedo, L.F. Garcia, J.R. Oliveira-Neto, K.C.S. Leite, V.S. Ferreira, P.C. Ghedini, E.S. Gil, *Food Chem.* **2017**, 217, 326.
- [39] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25.
- [40] M.S.M. Rufino et al., *Comunicado técnico on line, Embrapa ISSN 1679-6535*, **2007**.
- [41] V.L. Singleton, J.A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144.
- [42] E.S. Gil, R.O. Couto, *Braz. J. Pharmacog.* **2013**, 23, 542.
- [43] A. Escarpa, *The Chemical Rec.* **2012**, 12, 72.

Os métodos eletroquímicos se mostraram eficientes devido à sua praticidade, baixo custo e baixo consumo de reagentes e amostras. Foi possível caracterizar as amostras de cervejas, conhecendo o perfil e otimizando parâmetros, como eletrodo, eletrólito e pH. O índice eletroquímico mostrou ser uma ferramenta rápida e apropriada para expressar a atividade antioxidante das cervejas e de suas principais matérias-primas, sendo que apresentou uma boa correlação com os ensaios de eliminação de radicais e também com o conteúdo de fenóis totais.

A análise de componentes principais conseguiu agrupar de acordo com a atividade antioxidante, sendo possível correlacionar com as variáveis que mais contribuem para tais separações e confirmando as informações provindas da metodologia eletroanalítica proposta.

As cervejas testadas exibiram efeito vasodilatador, principalmente dependente da presença de endotélio íntegro. Sugerindo ser ditado pela via do NO, já que quando a síntese deste foi inibida a vasodilatação diminuiu significativamente. Porém, são necessários mais experimentos para esclarecer o mecanismo pelo qual estas bebidas induzem o relaxamento. A capacidade de inibição da peroxidação lipídica também foi verificada e confirmada. Estas propriedades podem estar associadas com a presença de compostos fenólicos, identificados via espectrometria de massa.

O sensor construído, baseado ao dano à base nitrogenada (adenina), mostrou a capacidade da cerveja de proteção ao análogo do biocomponente. Este resultado se alinha com a capacidade de proteção ao dano, tal como a peroxidação.

Considerando estas informações, é possível sugerir que as cervejas aqui estudadas têm um efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular, desde que consumida moderadamente pois já é sabido os danos que o alto consumo de álcool pode causar ao organismo. Portanto, este estudo expande o conhecimento sobre a cerveja, o que é útil para pesquisas adicionais sobre a saúde, propriedades sensoriais e parâmetros de qualidade desta bebida mundialmente consumida.

Ainda sobre o ponto de vista da qualidade das cervejas, os extratos de lúpulo e malte foram estatisticamente diferentes uns dos outros, o que pode contribuir muito para escolher a matéria-prima na fabricação, aumentando assim a qualidade do produto final.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 21(2), 143-152, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, 33 (10), 2202-2210, 2010.

ANGULO, G.; KAPTURKIEWICZ, A.; PALMAERTS, A.; LUTSEN, L.; CLEIJ, T.J.; VANDERZANDE, D. Cyclic voltammetry studies of n-type polymers with non-alternant fluoranthene units. **Electrochimica Acta**, 54 1584-1588, 2009.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23, 121-128, 2003.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, 11(11), 419-421, 2000.

ARRANZ, S.; CHIVA-BLANCH, G.; VALDERAS-MARTÍNEZ, P.; MEDINA-REMÓN, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ESTRUCH, R. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. **Nutrients**, 4, 759-781, 2012.

ARRIBAS, A. S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **Trends in Analytical Chemistry**, 34, 78-96, 2012.

ARTEAGA, J. F. *et al.* Comparison of the Simple Cyclic Voltammetry (CV) and DPPH Assays for the Determination of Antioxidant Capacity of Active Principles. **Molecules**, 17, 5126-5138, 2012.

ASSIS, A. P. Desenvolvimento De Um Método Voltamétrico Para Determinação Do Herbicida Tebutiuram Em Amostras De Açúcar. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2012.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89, 27-36, 2005.

BAMFORTH, C. W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. **Chem. Educator**, 5, 102-112, 2000.

BAMFORTH, C. W. Nutritional aspects of beer-Review. **Nutrition Research**. 22, 227-237, 2002.

BARA, M. T. F.; SERRANO, S. H. P.; ASQUIERI, E. R.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S. **Lat. Am. J. Pharm.**, 27, 89-92, 2008.

BARROSO, M. F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; TUÑÓN-BLANCO, P. DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages. **Biosens. Bioelectron**. 26 (5), 2396–2401, 2011.

BARROSO, M. F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrocatalytic evaluation of DNA damage by superoxide radical for antioxidant capacity assessment. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 659, 43-49, 2011.

BABAEI, H.; SADEGHPOUR, O.; NAHAR, L.; DELAZAR, A. *et al.* Antioxidant and Vasorelaxant Activities of Flavonoids from *Amygdalus lycioides* var. *horrida*. **Turkish Journal of Biology**. 32, 203-208, 2008.

BAU, P. F. D.; BAU, C. H. D.; ROSITOD, G. A.; MANFROIE, W. C.; FUCHSE, F. D. Alcohol consumption, cardiovascular health, and endothelial function markers. **Alcohol**, 41, 479-488, 2007.

BGBI (1993). Teil 1 Das vorläufiges Biersteuergesetz von, 29,1399-1401.

BLASCO, A. J.; GONZALEZ, M.C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, 511,77-81, 2004.

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

BOTELHO, B. G. Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG. 2009.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 28, 25-30, 1995.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de junho de 1994. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 de junho de 2009.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 de setembro de 1997.

BRETT, C. M. A. e OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações. New York, US: Oxford University Press Inc., 1993.

CALLEMIEN, D.; JERKOVIC, V.; ROZENBERG, R.; COLLIN, S. Hop as an Interesting Source of Resveratrol for Brewers: Optimization of the Extraction and Quantitative Study by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 424-429, 2005.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade, 2011.

CAMPANELLA, L., BONANNI, A., FINOTTI, E., & TOMASSETTI, M. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: Comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. **Biosensors & Bioelectronics**, 19, 641-651, 2004.

CAMPANELLA L.; MARTINI E.; RITA G.; TOMASSETTI M. Antioxidant capacity of dry vegetal extracts checked by voltammetric method, **J. Food Agric. Environ.**, 4, 135-144, 2006.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. **Journal of Chromatography A**, 794, 263-297, 1998.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M. Spectrophotometric and coulometric detection in the high performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. **Journal of Chromatography A**, 881, 449-460, 2000.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A. T.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 8 (1), 76-88, 2001.

CHEVION, S.; BERRY, E. M.; KITROSSKY, N.; KOHEN, R. Evaluation Of Plasma Low Molecular Weight Antioxidant Capacity by Cyclic Voltammetry. **Free Radical Biology & Medicine**, 22 (3), 411-421, 1997a.

CHEVION, S.; HOFMANN, M.; ZIEGLER, R.; CHEVION, M.; NAWROTH, P. P.; The antioxidant properties of thiocctic acid: characterization by cyclic voltammetry, **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 41, 317-327, 1997b.

COLEMAN, H. A.; TARE, M.; PARKINGTON, H. C. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 31, 641-649, 2004.

CORREIA, H. S. N. *Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh. Perfil Polifenólico e Capacidade de Captação de Espécies Reativas de Oxigenio. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2005.

COSIO, M. S.; BURATTI, S.; MANNINO, S.; BENEDETTI, S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. **Food Chemistry**, 97, 725-731, 2006.

DE MARTINO, L. *et al.* Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. **Natural product communications**, 4(12), 1741-1750, 2009.

DE PASCUAL-TERESA, S.; TREUTTER, D.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Analysis of Flavanols in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography with Chemical Reaction Detection. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4209-4213, 1998.

DE PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Prodelphinidins and related flavanols in wine. **Int J Food Sci Technol** 35, 33-40, 2000.

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

EMREGÜL, E. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (6), 947–954, 2005.

ESTEVINHO, L. *et al.* Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, 46(12), 3774-3779, 2008.

FEGREDO, J. A.; MEYNELL, R.; LAI, A. K. H.; WONG, M. C. Y.; MARTIN, C. R.; WISEMAN, H.; PREEDY, V. R. The antioxidant capacity of beer: relationships between assays of antioxidant capacity, color and other alcoholic and non-alcoholic beverages. In: Preddy, V. R. (org.) **Beer in Health and Disease Prevention**. :Elsevier, 475-481, 2009.

FARIDBOD, F.; GUPTA, V. K.; ZAMANI, H. A. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Int. J Electrochem.**, doi:10.4061/2011/352546, 2011.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 93(3), 515-24, 1988.

FLORIDI, S.; MONTANARI, L.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Determination of Free Phenolic Acids in Wort and Beer by Coulometric Array Detection. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 1548-1554, 2003.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288(5789), 373-376, 1980.

FREITAS, G. L. Potencial Antioxidante e Compostos Fenólicos na Cerveja, Chopp, Cevada (*Hordeum vulgare* L.) e no Bagaço de Brassagem. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur Food Res Technol.**, 211, 56-64, 2000.

GARCÍA, A. A.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet

absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **J. Chromatography A**, 1054, 175-180, 2004.

GARCIA, L. F., et al. Laccase carbon paste based biosensors for antioxidant capacity. The effect of different modifiers. **International Journal Electrochemical Science**, 10, 5650-5660, 2015.

GASOWSKI, B., LEONTOWICZ, M., LEONTOWICZ, H., KATRICH, E., LOJEKC, A. The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15, 527-533, 2004.

GE, B., LISDAT, F. Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method. *Anal. Chim. Acta* 454 (1), 53–64, 2002.

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

GIL, E. S.; MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 46 (3), 375-391, 2010.

GHISELLI, A.; NATELLA, F.; GUIDI, A.; MONTANARI, L.; FANTOZZI, P.; SCACCINI, C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. **J. Nutr. Biochem.**, 11, 76–80, 2000.

GONÇALVES, D. *et al.* Voltametria De Pulso Diferencial (VPD) em Estado Sólido de Manchas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD): Um Novo Método De Análise Para Fitoativos Antioxidantes. **Química Nova**, 34, 2, 330-334, 2011.

GORMAN, R. R.; SUN, F. F.; MILLER, O. V.; JOHNSON, R. A. Prostaglandins H1 and H2. Convenient biochemical synthesis and isolation. Further biological and spectroscopic characterization. **Prostaglandins**, 13(6), 1043-1053, 1977.

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

HOTTA, H.; UEDA, M.; NAGANO, S.; TSUJINO, Y.; KOYAMA, J.; OSAKI, T. Mechanistic Study of the Oxidation of Caffeic Acid by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms. **Analytical Biochemistry**, 303, 66-72, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (6) 1841-1856, 2005.

JANATA, J. Centennial Retrospective on Chemical. **Anal. Chem.**, 161-163A, 2001

JANDERA, P. Methods for HPLC analysis of phenolics compounds and flavonoids in beer. In: Preddy, V. R. (org.) **Beer in Health and Disease Prevention**. : Elsevier, 1003-1014, 2009.

KENNEDY, J. A.; HAYASAKA, Y.; VIDAL S.; WATERS, E. J.; JONES, G. P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. **J Agric Food Chem**, 49, 5348-5355, 2001.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quim. Nova**, 23, 108-112, 2000.

KILMARTIN, P. A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A. L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics, **J. Agr.Food Chem.** 49, 1957-1965, 2001.

KLATSKY, A. Alcohol cardiovascular diseases and diabetes mellitus. **Pharmacological Research**, 55, 237-247, 2007.

KUNZE, W. Technology brewing and malting. Berlim: VLB, 433-435, 1997.

LAPCÍK, O.; HILL, M.; HAMPL, R.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of isoflavonoids in beer. **Steroids**, 63, 14-20, 1998.

LENCASTRE, R. P.; MATOS, C. D.; GARRIDO, J.; BORGES, F.; GARRIDO, E. M. Voltammetric quantification of fluoxetine: application to quality control and quality assurance processes. **Journal of Food and Drug Analysis**. 14, 242-251, 2006.

LINO, F. M. A.; SÁ, L. Z.; TORRES, I. M. S.; ROCHA, M. L.; DINIS, T. C. P.; GHEDINI, P. C.; SOMERSET, V. S.; GIL, E. S. Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. **Electrochimica Acta**, 128, 25-31, 2014.

MACCHI, G. The determination of ionic zinc in sea-water by anodic stripping voltammetry using ordinary capillary electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 9 (4), 290-298, 1965.

MANNINO, S.; BRENNA, O.; BURATTI, S.; COSI, M. S. A new method for the evaluation of the 'antioxidant power' of wines. **Electroanalysis**, 10, 908-912, 1998.

MASEK, A.; ZABORSKI, M.; CHRZESCIJANSKA, E. Electro oxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, 127, 699-704, 2011.

MELLO, L. D.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M.; KUBOTA, L. T. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, 21, 1374-1382, 2006.

MICHEL, C. C. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 30(12), 2541-2546, 1998.

MICHIELS, C.; BOUAZIZ, N.; REMACLE, J. Role of the endothelium and blood stasis in the development of varicose veins. **Int. Angiol.**, 21, 18-25, 2002.

MILNER, J. A. Molecular Targets for Nutrients Involved With Cancer Prevention . **Nutrition and Cancer**, 41, 1-16, 2000.

MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 3876-3884, 2000.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity . Songklanakarin J. Sci. Technol., 26, 211-219, 2004.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire: J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, 25, 31-46, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 95-111, 2004.

OLIVEIRA-NETO, J. R.; REZENDE, S. R.; REIS, C. F.; BENJAMIN, S. R.; ROCHA, M. L.; GIL, E. S. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. **Food Chemistry**, 190, 506-512, 2016.

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

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, 5 (4), 516-537, 2013.

PALMER, J. How to Brewer disponível em: <<http://www.howtobrew.com/>>. Acesso em 19 de julho de 2015.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, set 2007.

PAVSLER, A.; BUIATTI, S. Non-Lager Beer. In: Preddy, V. R. (org.) **Beer in Health and Disease Prevention**: Elsevier, 17-30, 2009.

PHILPOTT, J.; TAYLOR, D. M.; WILLIAMS, D. R. Critical assessment of factors affecting the accuracy of the IoB Bitterness Method. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. v. 55, n. 3, p. 103-106, 1997.

PRIETO-SIMÓN, B.; CORTINA, M.; CAMPÀS, M.; CALAS-BLANCHARD, C. Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. **Sensors and Actuators B**, 129, 459-466, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63 (7), 1035-1042, 2000.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **Journal of Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research**, 9 (4-5), 281-296, 1983.

RATHEE, J. S.; HASSARAJANI, S. A.; CHATTOPADHYAY, S. Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. **Food Chemistry**, 99 (3), 436-443, 2006.

REIS, N. S.; SERRANO, S. H. P.; MENEGHATTI, R. AND GIL, E. S. Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28, 949-953, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids And Phenolic Acids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20 (7), 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C., MILLER, N. *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, 2(4), 152-159, 1997.

RODRIGUEZ, R. J.; MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid

peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, 39, 437-445, 2001.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, 92, 235-254, 2005.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. **Comunicado técnico on line – EMBRAPA ISSN 1679-6535**, 2007.

SALONEN, J. T.; PUSKA P.; NISSINEM, A. Intake of spirits and beer and risk of myocardial infarction and death-a longitudinal study in eastern Finland. **Journal of Chronic Diseases**, 36, 533-543, 1983.

SANDOO, A.; VAN ZANTEN, J. J. C. S. V.; METSIOS, G. S.; CARROLL, D.; KITAS, G. D. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, 4, 302-312, 2010.

SEIDELMANN, S. B.; LIGHTHOUSE, J. K.; GREIF, D. M. Development and pathologies of the arterial wall. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 71 (11), 1977-1999, 2014.

SHOEN, F. J. Vasos sanguíneos. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 414-456, 1996.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.**, 299, 152-178, 1999.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A.; o processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alim. Nutr.** 19, 4, 491-498, 2008.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOTOMAYOR, M. D. P. T., KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, 25 (1), 123-128, 2002.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). Encyclopedia of sensors. Stevenson Ronchi: American Scientific, 2006. v. 1, p. 195-209.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, 30 (2), 351-355, 2007.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, 26 (1), 81-89, 2003.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, 103, 2, 215-223, 2003.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry., **J. Braz. Chem. Soc.**, 14 (2), 159-173, 2003.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, 14(4), 263-269, 2012.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. **Biosensors & Bioelectronics**, 16, 121-131, 2001.

TIPOS DE CERVEJA. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/tipo-cerveja.php>>. Acesso em: 10 de julho de 2016.

TIPOS DE CERVEJA. Disponível em <<http://www.cervesia.com.br/tipos-de-cerveja.html>>. Acesso em: 10 de julho de 2016.

VAQUERO, M. J. *et al.* Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, 18(2), 93-101, 2007.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, 28 (16), 3011-3016, 2000.

WANG, Y. *et al.* Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, 8, 2043-2081, 2008.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances In Physiology Education**, 27(4), 201-206, 2003.

WEIBURGER, J. H. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, 226(10), 891-897, 2001.

WEINREB, O.; MANDEL, S.; AMIT, T.; YODIM, M. B. H. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15, 506-516, 2004.

WHITTLE, N.; ELDRIDGE, H.; BARTLEY, J. Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical detection. **Journal of The Institute of Brewing**, 105, 89-99, 1999.

WOODMAN, O. L.; MEEKER, W. F.; BOUJAOUDE, M. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 46(3), 302-309, 2005.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Mol Cell Endocrinol**, 177, 135-143, 2001.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In: Preddy, V. R. (org.) **Beer in Health and Disease Prevention**: Elsevier, 3-16, 2009.

YAKOVLEVA, K. E.; KURZEEV, S. A.; STEPANOVA, E. V.; FEDOROVA, T. V.; KUZNETSOV, B. A.; KOROLEVA, O. V. Characterization of Plant Phenolic Compounds by Cyclic Voltammetry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 43 (6), 661-668, 2007.

YE-MEI, L.; XIAN-TANG, C.; JUN, L.; HUI-HONG, L. Direct voltammetry and catalysis of hemoenzymes in methyl cellulose film. **Electrochimica Acta**, 49, 3195-3200, 2004

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

Anexo 1 – Normas para publicação – Artigo 1

**JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS**

Journal of Functional Foods is the official scientific journal of the International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

-
- Description p.1
 - Audience p.1
 - Impact Factor p.2
 - Abstracting and Indexing p.2
 - Editorial Board p.2
 - Guide for Authors p.3

ISSN: 1756-4646



Disponível online em:

<https://www.elsevier.com/journals/journal-of-functional-foods/1756-4646/guide-for-authors>

Anexo 2 – Normas para publicação – Artigo 2

ELECTROANALYSIS
An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices

Author Guidelines

1.1.1. 1 Aims and Scope

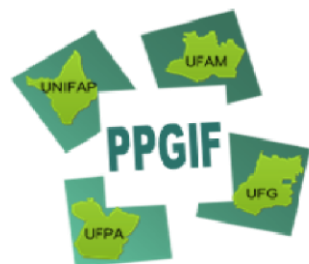
Electroanalysis is an international, strictly peer-reviewed journal containing critical Reviews, Short Communications and Full Papers, devoted to fundamental and practical aspects of electroanalysis. The scope of *Electroanalysis* includes advances in analytical voltammetry and potentiometry, new electrochemical sensors and detection schemes, novel electrode materials, advanced instrumentation, nanoscale electrochemistry, advanced electromaterials, nanobioelectronics, point-of-care diagnostics, wearable sensors, and practical applications in the biomedical, environmental, industrial, pharmaceutical, and food fields. *Electroanalysis* is a vital medium for research scientists and serves as a bridge between the research laboratory and the routine analytical laboratory. *Electroanalysis* is published 12 times a year.

ISSN: 1040-0397

Disponível online em:

https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15214109/homepage/2049_guidelines.html

Apêndice 1



I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica - PPGIF

Certificado

Certificamos que **Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto** realizou apresentação na forma oral no I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica – PPGIF, realizado no Centro de Aulas D, da Universidade Federal de Goiás - UFG, na cidade de Goiânia-GO, nos dias 08 e 09 de dezembro de 2014.

Valéria de Oliveira
Coordenadora do PPGIF

CERTIFICADO

XX SIBEE
UBERLÂNDIA – MG

Certificamos que o trabalho **“ELA071 - Determinação eletroquímica e espectrofotométrica da capacidade antioxidante de cervejas de diferentes marcas e classes”** de autoria de *JERÔNIMO RAIMUNDO DE OLIVEIRA NETO, STEFANI GARCIA REZENDE, KARLA CARNEIRO DE SIQUEIRA LEITE, BONIEK GONTIJO VAZ, ERIC DE SOUZA GIL* foi apresentado na modalidade de **COMUNICAÇÃO ORAL** durante o **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)**, realizado de 17 a 21 de agosto de 2015, no *Center Convention* em Uberlândia-MG.

Uberlândia, 21 de agosto de 2015.



67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry
21-26 August, 2016
The Hague, The Netherlands

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that Paulo Cesar Ghedini participated with the Poster presentation entitled Antioxidant Activity of Beer using a Carmin Paste Adenine-Biosensor at the 67 Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry on 21-26 August, 2016 in The Hague, The Netherlands.

(Co-Authors: Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, Ruiter Moraes Lima, Gérman Sanz Lobón, Karla Carneiro de Siqueira Leite, Boniek Gontijo Vaz, Eric Gil)

Kind regards,
Marc Koper
Conference co-chair 67^k Annual Meeting of the
International Society of Electrochemistry

Electroanalysis for Quality Control of Acerola (*Malpighia emarginata*) Fruits and their Commercial Products

Stephen Rathinaraj Benjamin & Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto & Isaac Yves Lopes de Macedo & Maria Teresa Freitas Bara & Luiz Carlos da Cunha & Luiz Alcir de Faria Carvalho & Eric de Souza Gil

Received: 28 January 2014 / Accepted: 14 April 2014 / Published online: 4 May 2014

Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The use of natural antioxidants is widespread around the world since they may delay oxidative stress and, consequently, degenerative diseases. Among the prescribed healthy habits for humans is the consumption of fruits containing high levels of phenolic compounds and other radical scavengers. Acerola (*Malpighia emarginata*) is very appreciated for its high content of ascorbic acid (AA) and rutin, two remarkable natural antioxidants (NA). Industrialized as frozen pulp and processed as juice, it is also a good source of carotenoids and anthocyanins. Nevertheless, its commercialization is hindered by its low stability. Considering the great potential of acerola frozen and dried products as rich sources of NA, the development of analytical methods focusing on the determination of active components is imperative for their quality control. Therefore, the aim of this work was to apply differential pulse voltammetry (DPV) for quality control of different products made of acerola fruits. Quality control samples consisted of acerola products spiked with AA, which was the biomarker, compared with its contents in samples

S. R. Benjamin: J. R. de Oliveira Neto: I. Y. L. de Macedo:

M. T. F. Bara: L. C. da Cunha: L. A. de Faria Carvalho

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

E. de Souza Gil (*)

Avenida Universitária com 1ª, Avenida, Quadra 62, 2º andar, Sala 36, 74605-220 Goiânia, GO, Brazil

e-mail: ericsgil@gmail.com

analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-PDA). DPV was employed for quantification of AA in all samples. The achieved limits of detection and quantification were 0.31 and 0.96 mM, respectively, whereas the recovery range was from 97.4 to 102.2 %; the results presented good accuracy and correlation with HPLC-PDA method. In addition to its use in identification, DPV proved to be helpful to check the integrity of natural products and avoid adulteration. Moreover, the electrochemical index proposed is in accordance with traditional methods for estimating antioxidant capacity.

Research Highlights • Voltammetric profiles can be used as a tool for tentative identification of acerola products.

- The main peak of acerola samples shows great correlation with ascorbic acid.
- Quantitative determination of ascorbic acid in crude samples is achieved using a cheap and fast electroanalytical method.

Keywords Acerola . Quality control . Antioxidants . HPLC-PDA . Dried extract . Frozenpulp



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Analytical Methods

Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples



Jerônimo Raimundo Oliveira-Neto, Stefani Garcia Rezende, Carolina de Fátima Reis, Stephen Rathinaraj Benjamin, Matheus Lavorenti Rocha, Eric de Souza Gil*

Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Av. Universitária s/n, 74605-220 Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2015
Received in revised form 18 May 2015
Accepted 25 May 2015
Available online 2 June 2015

Keywords:

Coffee brews
Chlorogenic acid
Caffeic acid
Antioxidant activity
Redox behavior
HPLC

ABSTRACT

The redox behavior of commercial roasted coffee products were evaluated by electroanalysis, whereas high performance liquid chromatography (HPLC) was used for determination of cinnamic acid markers, the total phenolic content (TPC) was achieved by Folin–Gocalteu assay, and the traditional DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method for antioxidant power determination. In turn, an optimized electrochemical index was proposed to estimate the antioxidant power of different samples and it was found a great correlation between all methods. The voltammetric profile of all coffee samples was quite similar, presenting the same number of peaks at the same potential values. Minor differences on current levels were in agreement with the total phenolic and major markers content, as well as, to the antioxidant power. Therefore, the electrochemical methods showed to be practical, low cost and very useful to evaluate the antioxidant properties of coffee samples, which is a relevant quality parameter of this widely consumed beverage.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Analytical Methods

Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts



Isaac Yves Lopes de Macêdo, Luane Ferreira Garcia, Jerônimo Raimundo Oliveira Neto, Karla Carneiro de Siqueira Leite, Valdir Souza Ferreira, Paulo César Ghedini, Eric de Souza Gil*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Rua 240 com 5a avenida, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2016

Received in revised form 23 August 2016

Accepted 23 August 2016

Available online 26 August 2016

Keywords:

Redox behavior

Antioxidant power assays

Electrochemical index

DPPH assay

Natural antioxidants

ABSTRACT

Red fruits are rich sources of antioxidant compounds with recognized health benefits. Since they are perishable, dried extracts emerge as more durable products and their quality control must include antioxidant capacity assays. In this study, the redox behavior of commercial dried products obtained from camu-camu, açaí, acerola and cranberry red fruits was evaluated by electroanalytical approaches. The antioxidant potential was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical assay and the electrochemical index concept. The total phenol content was estimated by using a laccase based biosensor. A significant correlation was found between all methods and literature data. The voltammetric profile (cyclic, differential and square wave) obtained for each type of dried extract showed distinguishable features that were correlated with their main major markers, being also useful for identification purposes. The electrochemical methods were cheaper and more practical for evaluation of antioxidant properties and total phenol content in dried powders obtained from different red fruits.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.