



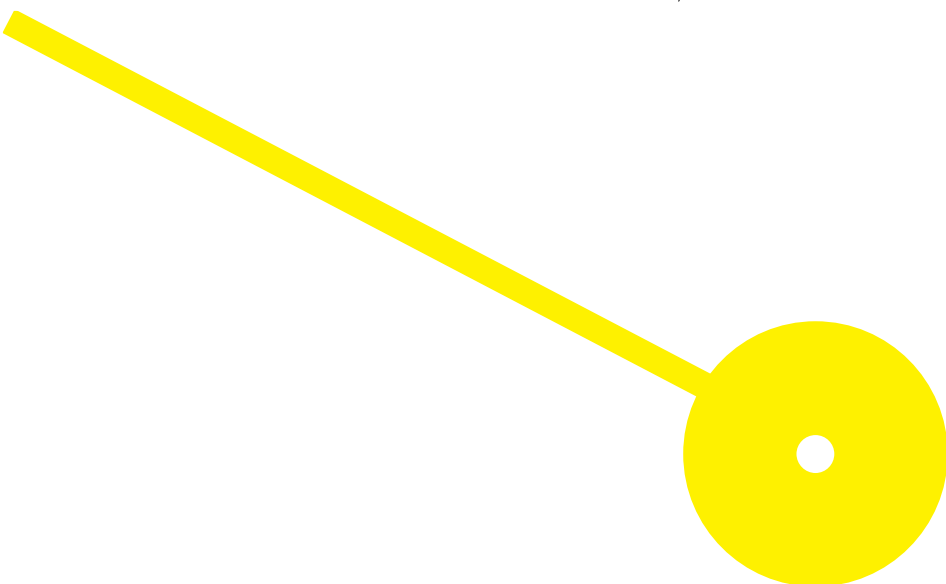
MESTRADO

FARMÁCIA – TECNOLOGIA DO MEDICAMENTO E DE PRODUTOS DE SAÚDE

Cervejas Artesanais Portuguesas e Espanholas: Atividade Antioxidante e Toxicidade Hepática

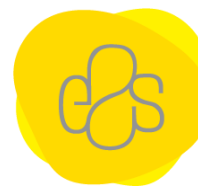
Diana Raquel Bessa dos Santos

10/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Cervejas Artesanais Portuguesas e Espanholas: Atividade Antioxidante e Toxicidade Hepática

Autor

Diana Raquel Bessa dos Santos

Orientadores

Professora Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde,
Instituto Politécnico do Porto

Professora Doutora Ana Isabel de Freitas Tavares de Oliveira, REQUIMTE/LAQV, Escola Superior
de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Farmácia – Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Inspirada pelas palavras de Antoine Lavoisier, "Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma." posso afirmar que este último ano se transformou no aumento do meu conhecimento acadêmico e pessoal, e numa enorme gratidão a todos os que fizeram parte deste caminho.

À Professora Doutora Cláudia Pinho e à Professora Doutora Ana Isabel Oliveira, o meu sincero agradecimento pelo acompanhamento incansável, pela orientação sábia, pelos ensinamentos valiosos e por toda a disponibilidade generosa ao longo deste percurso.

À minha mãe, ao meu pai, à minha irmã e ao meu cunhado, expresso um agradecimento especial pelo apoio constante durante as incontáveis horas que dediquei a este projeto. Agradeço por terem estado sempre ao meu lado, oferecendo compreensão e incentivo, e por acreditarem sempre no meu potencial.

Aos meus amigos, que me proporcionaram momentos de descontração e alegria, o meu muito obrigada por estarem sempre comigo. Em especial, à Maria João, com quem tive o privilégio de compartilhar cada desafio, cada descoberta e cada gargalhada, tornando tudo mais leve dia após dia.

A todas as outras pessoas que, de alguma forma, fizeram parte deste percurso agradeço cada palavra, gesto e ação.

Que este trabalho seja um reflexo daquilo que aprendi e, acima de tudo, que seja um tributo a todas as pessoas que me orientaram, apoiaram e inspiraram ao longo deste caminho.

Resumo

O consumo de cerveja artesanal tem aumentado, destacando-se como bebida funcional pelos benefícios para a saúde, devido à presença de compostos antioxidantes. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e toxicidade hepática, *in vitro*, de estilos de cervejas artesanais portuguesas e espanholas, com e sem incorporação de extrato de cereja variedade "Lapins". Analisaram-se nove cervejas artesanais e duas industriais após desalcoolização, degaseificação e liofilização. Determinou-se o teor de fenólicos totais (TPC), a atividade antioxidante, e a toxicidade hepática em células de hepatocarcinoma (HepG2). As cervejas artesanais BP-N e IS-N demonstraram o maior TPC ($9,5 \pm 0,3$ e $8,3 \pm 0,2$ mg GAE/g, respetivamente), e a IS-N apresentou capacidade antioxidante moderada no ensaio ABTS ($IC_{50} = 80,1 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$) e alta no ensaio peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ($IC_{50} = 27,0 \pm 1,5$ $\mu\text{g/mL}$). A incorporação do extrato aquoso (EAC) e etanólico (EEC) de cereja ocorreu na cerveja com resultados dos ensaios antioxidantes e viabilidade celular mais promissores (IS-N). A adição dos extratos à cerveja diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a sua atividade antioxidante, e não reduziu a citotoxicidade induzida pelo *t*-BOOH, exceto no caso de IS-N em solvente aquoso com EEC, em co-incubação.

Palavras-chave: cervejas artesanais; compostos fenólicos; atividade antioxidante; toxicidade hepática; hepatoproteção

Abstract

The consumption of craft beer has increased, standing out as a functional drink for its health benefits, due to the presence of antioxidant compounds. The objective of the work was to evaluate the antioxidant activity and liver toxicity, *in vitro*, of Portuguese and Spanish craft beer styles, with and without incorporation of cherry extract from the 'Lapins' variety. Nine craft and two industrial beers were analyzed after dealcoholization, degassing and freeze-drying. The total phenolic content (TPC), the antioxidant activity of the samples, and the liver toxicity in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells were determined. Craft beers BP-N and IS-N demonstrated the highest TPC (9.5 ± 0.3 and 8.3 ± 0.2 mg GAE/g, respectively). IS-N showed moderate antioxidant capacity in the ABTS assay ($IC_{50}=80.1\pm 1.1$ μ g/mL) and high in the hydrogen peroxide (H_2O_2) assay ($IC_{50}=27.0\pm 1.5$ μ g/mL). PA-ET showed the best iron reducing power (FRAP) (44.7 ± 0.0 μ mol TE/g). The incorporation of aqueous (EAC) and ethanolic (EEC) cherry extract occurred in beer with results from the most promising antioxidant and cell viability assays (IS-N). The addition of the extracts to beer significantly ($p<0.05$) decreased its antioxidant activity, and did not reduce the cytotoxicity induced by *t*-BOOH, except in the case of IS-N in aqueous solvent with EEC in co-incubation.

Keywords: craft beers; phenolic compounds; antioxidant activity; liver toxicity; hepatoprotection

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	VIII
Índice de Tabelas.....	X
Índice de Figuras.....	XI
1. Introdução.....	1
1.1. Mercado e Consumo de Cerveja Artesanal.....	3
1.2. Processo de Produção de Cerveja.....	4
1.3. Estilos de Cerveja.....	7
1.4. Composição da Cerveja.....	8
1.5. Cerveja como Bebida Funcional.....	13
1.5.1. Incorporação de Plantas Medicinais e de Frutos na Cerveja.....	13
1.5.2. Incorporação de Probióticos na Cerveja.....	17
1.5.3. Incorporação de Outros Ingredientes Funcionais na Cerveja.....	19
1.6. Atividade Antioxidante e Hepatoprotetora da Cerveja e Matérias-primas.....	21
2. Objetivos.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Tipo de Estudo, Duração e Local de Realização.....	25
3.2. Reagentes.....	25
3.3. Seleção e Preparação das Amostras.....	26
3.3.1. Cervejas Artesanais e Industriais.....	26
3.3.2. Extratos de Cereja-Doce Variedade "Lapins".....	27
3.4. Parâmetros Físico-Químicos das Cervejas.....	28

3.4.1. Teor de álcool, cor e amargor.....	28
3.4.2. Determinação do pH.....	28
3.4.3. Determinação da Acidez Total.....	29
3.4.4. Teor de Açúcares Redutores (TAR).....	29
3.5. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC)	29
3.6. Ensaio Atividade Antioxidante	30
3.6.1. Ensaio de Neutralização do Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	30
3.6.2. Ensaio do Peróxido de Hidrogénio (H ₂ O ₂).....	31
3.6.3. Ensaio do Poder Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP).....	31
3.6.4. Atividade Quelante de Metais (MCA).....	32
3.7. Cultura Celular.....	32
3.7.1. Linha Celular e Condições de Cultura.....	32
3.7.2. Toxicidade Celular	32
3.7.3. Proteção das Amostras de Cerveja e Extratos de Cereja Contra a Toxicidade Induzida por <i>tert</i> -butil hidroperóxido em Células HepG2.....	33
3.8. Análise Estatística.....	34
4. Resultados e Discussão.....	35
4.1. Análise dos Parâmetros Físico-Químicos das Cervejas	35
4.1.1. Teor de Álcool (<i>Alcohol by Volume</i> - ABV).....	35
4.1.2. Cor (<i>European Brewery Convention</i> - EBC).....	38
4.1.3. Amargor (Unidades Internacionais de Amargor - IBU).....	39
4.1.4. pH.....	41
4.1.5. Acidez Total	41
4.1.6. Teor de Açúcares Redutores (TAR).....	42
4.2. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC)	43

4.3.	Determinação da Capacidade Antioxidante das Cervejas.....	48
4.3.1.	Ensaio de Neutralização do Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	48
4.3.2.	Ensaio do Peróxido de Hidrogénio (H ₂ O ₂).....	51
4.3.3.	Ensaio do Poder Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP).....	52
4.3.4.	Atividade Quelante de Metais (MCA).....	53
4.3.5.	Correlação entre Características Físico-Químicas, TPC e Ensaio Antioxidantes.....	54
4.4.	Incorporação de Extratos de Cereja Variedade "Lapins" na Cerveja.....	56
4.4.1.	Determinação do TPC nos Extratos de Cereja Variedade "Lapins"	58
4.4.2.	Determinação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Cereja Variedade "Lapins".....	60
4.5.	Toxicidade Hepática das Cervejas e dos Extratos de Cereja Variedade "Lapins"	63
4.6.	Análise Química da Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade "Lapins"	72
4.7.	Determinação do TPC na Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade "Lapins"	75
4.8.	Determinação da Atividade Antioxidante da Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade "Lapins"	77
4.9.	Toxicidade Hepática da Cerveja Após Incorporação dos Extratos de Cereja Variedade "Lapins"	80
4.10.	Avaliação da Proteção Contra Danos Causados pelo <i>tert</i> -butil hidroperóxido.....	83
5.	Conclusão.....	92
	Referências Bibliográficas.....	97
	Apêndices.....	127
	Protocolos experimentais	138

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

·OH	Radicais Hidroxilo
AAE	Equivalentes de Ácido Ascórbico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABV	<i>Alcohol by Volume</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ApoA	Apolipoproteína A
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAC	Extrato Aquoso de Cereja Variedade "Lapins"
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EDTAE	Equivalentes de Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EEC	Extrato Etanólico de Cereja Variedade "Lapins"
ES	Extrato Seco
FBS	Soro Bovino Fetal
Fe ²⁺	lão Ferroso
Fe ³⁺	lão Férrico
FRAP	Poder Antioxidante da Redução do Ferro
GA	Ácido Gálico
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
GE	Equivalentes de Glicose
GSH	Glutationa reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de Elevada Densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção de Arranjo de Díodos
IBU	Unidades Internacionais de Amargor

IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
MCA	Atividade Quelante de Metais
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
NAOH	Hidróxido de Sódio
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais de Oxigénio
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PF	Peso Fresco
QE	Equivalentes de Quercetina
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
TAR	Teor de Açúcares Redutores
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
TE	Equivalentes de Trolox
TFC	Teor de Flavonoides Totais
TPC	Teor de Fenólicos Totais
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

Índice de Tabelas

Tabela 1. Definição de cerveja/ervejeira artesanal em diferentes países.	2
Tabela 2. Identificação de compostos fenólicos em cervejas artesanais e industriais.	10
Tabela 3. Teor de compostos fenólicos (mg/100 g peso fresco) na variedade "Lapins"	15
Tabela 4. Microrganismos mais comuns estudados quanto às propriedades probióticas.....	17
Tabela 5. Características e codificação das cervejas selecionadas para o estudo.....	26
Tabela 6. Parâmetros físico-químicos das cervejas em estudo (álcool, cor, amargor, pH, acidez total e teor de açúcares redutores).	36
Tabela 7. Resultados da determinação do teor de fenólicos totais (TPC) nas cervejas.....	44
Tabela 8. Resultados da capacidade antioxidante das cervejas analisadas, pelos ensaios ABTS, H ₂ O ₂ , FRAP e ferrozina.....	49
Tabela 9. Correlação entre parâmetros físico-químicos da cerveja, teor de fenólicos totais (TPC) e ensaios antioxidantes.....	55
Tabela 10. Resultados da capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade "Lapins", pelos ensaios ABTS, H ₂ O ₂ , FRAP e ferrozina.	61
Tabela 11. Análise química (pH, acidez total e teor de açúcares redutores) da cerveja controlo (IS-N) e das cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade "Lapins" (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).	73
Tabela 12. Resultados do ensaio de determinação do teor de fenólicos totais (TPC) para a cerveja controlo (IS-N) e para as cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade "Lapins" (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).....	75
Tabela 13. Resultados dos ensaios ABTS, H ₂ O ₂ , FRAP e ferrozina da cerveja controlo (IS-N) e das cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade "Lapins" (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).....	78

Índice de Figuras

Figura 1. Esquematização do processo de maltagem.....	4
Figura 2. Coloração das diferentes variedades de malte.....	5
Figura 3. Esquematização do processo de produção de cerveja.....	5
Figura 4. Principais estilos de cerveja artesanal.....	7
Figura 5. Principais chalconas preniladas e flavanonas isoméricas do lúpulo.....	9
Figura 6. Variedades de cereja-doce: (a) Durona, (b) Lapins; (c) Summit; (d) Van.....	15
Figura 7. Alterações resultantes das espécies reativas de oxigénio e de azoto.....	21
Figura 8. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja BA-ET, DB-ET e IS-ES, em células HepG2. Cerveja BA-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,5% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja DB-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,8% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja IS-ES em solvente aquoso e em solvente etanólico (9,1% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F).	65
Figura 9. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja PA-ET, BP-N e IPA-N, em células HepG2. Cerveja PA-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,0% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja BP-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (4,8% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja IPA-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,0% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F).	66
Figura 10. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja IS-N, L-N e P-L, em células HepG2. Cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (8,5% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja L-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja P-L em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F).....	67
Figura 11. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja SS-SB e P-SB, em células HepG2. Cerveja SS-SB em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja P-SB em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,2% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D).....	68
Figura 12. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações do extrato aquoso e etanólico (70% (V/V)) de cereja variedade "Lapins", após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2.....	71
Figura 13. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins", e cerveja IS-N em	

solvente aquoso + Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2.....	81
Figura 14. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5% (V/V)) + Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2.....	82
Figura 15. Atividade metabólica do tert-butil hidroperóxido em diferentes concentrações em células HepG2.....	84
Figura 16. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação (A) e co-incubação (B), de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (8,5% (V/V)), em células HepG2.....	85
Figura 17. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação (A) e co-incubação (B), de diferentes concentrações do extrato aquoso e etanólico (70% (V/V)) de cereja variedade "Lapins", em células HepG2.....	86
Figura 18. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação, de diferentes concentrações da cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)) (A), e cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5 % (V/V)) + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70% (V/V)) (B), em células HepG2.....	89
Figura 19. Efeito citoprotetor, no regime de co-incubação, de diferentes concentrações da cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)) (A), e cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5 % (V/V)) + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70% (V/V)) (B), em células HepG2.....	90

1. Introdução

A indústria cervejeira tem passado por transformações nas últimas décadas, verificando-se um aumento exponencial da produção e do consumo de cerveja artesanal. A expansão de cervejeiras artesanais teve início na década de 1970 nos Estados Unidos, tendo a Europa Ocidental aderido a esta tendência na década de 1980 (Pokrivčák et al., 2019). Em Portugal, embora a produção de cerveja industrial se tenha consolidado no final do século XVIII e ao longo do século XIX, as empresas produtoras de cerveja artesanal só a partir de 2010 começaram a ter verdadeira expressão (Museu Da Cerveja, n.d.).

De acordo com a legislação portuguesa, a cerveja é uma “bebida obtida por fermentação alcoólica, de um mosto preparado a partir de água potável e de malte de cereais, por ação de leveduras, ao qual são adicionadas flores de lúpulo e/ou seus derivados, cujos maltes de cereais deverão corresponder a, pelo menos, 50% em massa do total das matérias-primas fontes de açúcares empregues” (Portaria n.º 91/2022, de 9 de fevereiro, 2022).

A definição de cerveja artesanal não se encontra legislada em Portugal e varia entre países (Tabela 1). Deste modo, a cerveja artesanal é caracterizada por vários autores como sendo uma cerveja produzida por métodos tradicionais, utilizando matérias-primas tradicionais e de qualidade, às quais podem ser adicionadas matérias-primas inovadoras como frutas, extratos de plantas aromáticas e/ou medicinais e probióticos que conferem aromas e sabores diferenciados, podendo ser uma bebida promotora da saúde, pelas propriedades nutricionais e biológicas promissoras (Aquilani et al., 2014; Březinová, 2021; Tirado-Kulieva et al., 2023). Além disso, as cervejas artesanais, habitualmente, não são filtradas, nem pasteurizadas, nem são alvo de adição de dióxido de carbono (CO₂) (Capece et al., 2018). As características mencionadas contrastam com as cervejas industriais que são produzidas em grandes quantidades, recorrendo a ingredientes padrão, sendo submetidas a níveis de controlo de qualidade rigorosos, bem como a processamento e filtração (Jaeger et al., 2020).

Assim sendo, a autenticidade, inovação, criatividade e qualidade do produto fazem com que as cervejas artesanais se diferenciem das industriais, pelo que se verifica o aumento da sua popularidade, bem como o interesse de as tornar num produto de valor acrescentado para o consumidor (Donadini & Porretta, 2016; Mascia et al., 2014; S. Silva et al., 2022).

Tabela 1. Definição de cerveja/cervejeira artesanal em diferentes países.

País	Definição de cerveja/cervejeira artesanal	Referência
Austrália	Produção inferior a 400 mil hectolitros/ano; Menos de 20% do capital detido por uma grande cervejeira.	(Independent Brewers Association, 2018)
Brasil	Produção de cerveja até 50 mil hectolitros/ano; Cervejeira independente de qualquer cervejeira maior.	(R. Silva, 2018)
Espanha	Produção máxima de 50 mil hectolitros/ano; Usa somente malte, cevada e/ou trigo, como fonte de amido; Não ser propriedade direta ou indireta de uma empresa que não cumpra os volumes/método/ingredientes da cerveja artesanal.	(AECAI, n.d.)
Estados Unidos da América	Produção anual de 6 milhões de barris de cerveja ou menos; Menos de 25% da cervejeira artesanal é da propriedade ou controlada por um membro da indústria de bebidas alcoólicas, que não uma cervejeira artesanal; A cerveja é feita com ingredientes tradicionais, mas podem ser adicionados ingredientes não tradicionais para distinção.	(Brewers Association, n.d.)
Itália	Produção de cerveja inferior a 200 mil hectolitros/ano; Cerveja não submetida à pasteurização e microfiltração; Cervejeira totalmente independente de qualquer cervejeira maior.	(Disegno Di Legge N. 1328-B, Art.35, 2017)
Reino Unido	Produção de cerveja inferior a 200 mil hectolitros/ano; Cervejeira totalmente independente de qualquer cervejeira maior; Cumpra com os padrões de qualidade e segurança alimentar da <i>Society of Independent Brewers</i> .	(SIBA Journal, 2017)

1.1. Mercado e Consumo de Cerveja Artesanal

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2018 a cerveja foi o segundo tipo de bebida mais consumido em todo mundo, representando 25% e 44% do consumo de álcool registado *per capita* em Portugal e em Espanha, respetivamente (World Health Organization, 2018, 2022).

O mercado global de cerveja artesanal, no mesmo ano, estava avaliado em 108,91 bilhões US\$, sendo expectável uma taxa de crescimento anual de 8%, atingindo, desta forma, 186,59 bilhões US\$ até 2025. Na Europa prevê-se um potencial de crescimento de 1324,31 milhões de litros de cerveja artesanal até 2024, o que representa a maior participação de mercado em termos de valor e volume. Os Estados Unidos e a Europa são os maiores distribuidores de cerveja artesanal respondendo por 46% e 43%, respetivamente (Baiano, 2021).

Embora a cerveja industrial seja a mais consumida, a produção e consumo de cerveja artesanal tem vindo a aumentar. Assim, em Portugal, um total de 686 mil indivíduos consumiram cerveja artesanal, em 2021, verificando-se uma maior expressão entre indivíduos do sexo masculino (10,3%), face a um consumo de 6,6% entre indivíduos do sexo feminino. Além disso, um em cada quatro consumidores de cerveja artesanal encontra-se na faixa etária entre 55-64 anos (Grupo Marktest, 2022). Por sua vez, dados do mercado espanhol refletem um crescimento de 79,6% na produção de cerveja artesanal de 2015 a 2019, passando de 12,4 milhões de litros para 22,4 milhões de litros (AECAI, n.d.). Desta forma, o mercado de produção de cerveja artesanal espanhola é detentor de uma quota de mercado de 1,1% (AECAI, n.d.).

O setor cervejeiro é considerado um setor-chave para o crescimento da economia em Portugal, contabilizando um total de 100 empresas cervejeiras, das quais 96 são microcervejeiras que se dedicam principalmente à produção de cerveja artesanal (APCV- Associação Cervejeiros de Portugal, 2021; Duarte & Brinca, 2021). Em Espanha, até 2020, foram contabilizadas 420 produtoras de cervejas artesanais, sendo produzido um total de 17 498 475 litros (AECAI, n.d.).

Em suma, na Europa, tem-se verificado um aumento do número dos microprodutores que se dedicam ao fabrico de cerveja artesanal a fim de atenderem à procura do consumidor por este tipo de produto, dado este ser considerado pelos mesmos um produto de qualidade superior, que oferece uma vasta diversidade de sabores, autenticidade, sustentabilidade e reconhecimento social (Duarte & Brinca, 2021; Salant et al., 2020; The Brewers of Europe, 2020).

1.2. Processo de Produção de Cerveja

No fabrico de cerveja recorre-se a quatro ingredientes base, ou seja, água, malte, lúpulo (*Humulus lupulus* L.) e levedura (Vivian et al., 2016; Wunderlich & Back, 2009). Porém, o produto final pode ser diversificado com a adição de outros ingredientes que conferem características e propriedades únicas à cerveja (Habschied, Živković & Živković, et al., 2020; Vivian et al., 2016).

A produção de cerveja artesanal inicia-se com o processo de maltagem (Figura 1), no qual durante a germinação dos cereais (principalmente cevada, mas também trigo, aveia, centeio e arroz) são ativadas e produzidas enzimas hidrolíticas, como enzimas que digerem as proteínas (aminopeptidases e carboxipeptidase), o amido (α -amilase e β -amilase), as paredes celulares (β -glucanases) e os ácidos gordos (lipoxigenase). Desta forma, o malte não é mais do que os grãos de um cereal que foram sujeitos a um processo de maltagem, em que, de forma controlada, o processo deixa que os grãos germinem até um certo ponto (Vivian et al., 2016; Wunderlich & Back, 2009).

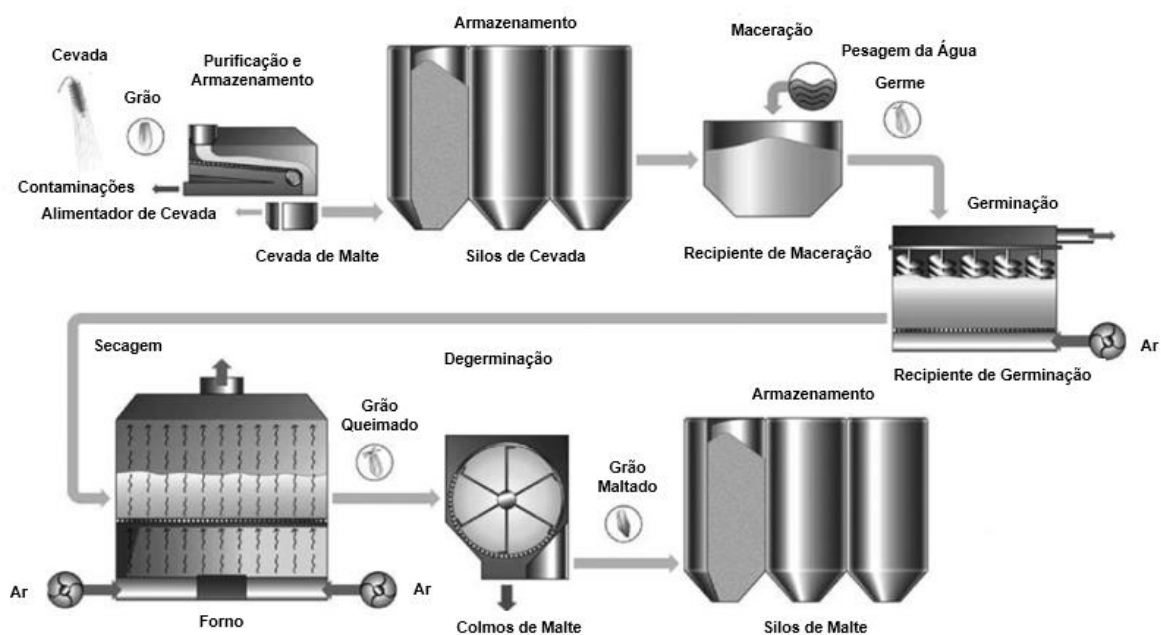


Figura 1. Esquematização do processo de maltagem (Adaptado de Wunderlich e Back (2009)).

De forma a interromper a atividade enzimática, procede-se à secagem dos grãos a uma temperatura entre 85 °C e 200 °C, dependendo do aroma e coloração pretendido (Figura 2) (Vivian et al., 2016; Wunderlich & Back, 2009). Desta forma, os maltes podem ser categorizados

de diferentes formas, como por exemplo, *High aroma*, *Biscuit*, *Caramel*, *Crystal*, *Chocolate*, *Coffee* e *Black*, contendo sabores característicos (torrado, frutado, caramelizado, entre outros) (Su et al., 2022).



Figura 2. Coloração das diferentes variedades de malte (Adaptado de Academia Artesanal (2018) e EZbrew (2021)).

De seguida, procede-se à moagem dos grãos maltados (Figura 3), de forma a aumentar a superfície de atividade das enzimas, bem como facilitar a dissolução dos ingredientes do malte (Wunderlich & Back, 2009). O malte triturado é misturado com água e aquecido a diferentes temperaturas (brassagem), com o intuito do amido ser convertido em açúcares mais simples, como maltose e glicose, por ação das enzimas (Vivian et al., 2016; Wunderlich & Back, 2009). Deste modo, forma-se o mosto, que além de ser rico em açúcares, possui proteínas solúveis, péptidos e aminoácidos (Vivian et al., 2016).

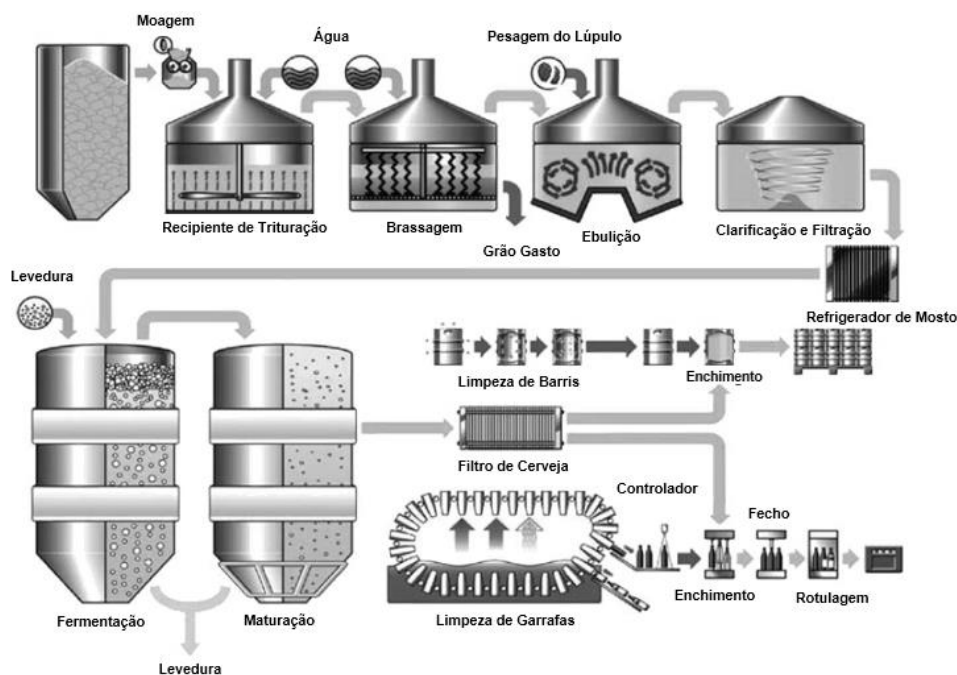


Figura 3. Esquemática do processo de produção de cerveja (Adaptado de Wunderlich e Back (2009)).

O mosto é transferido para a caldeira de ebulição, e durante a sua ebulição é adicionada uma ou várias variedades de lúpulo, dependendo do amargor pretendido. Esta etapa resulta na evaporação de substâncias que possuem sabor indesejado (como o dimetilsulfureto), floculação de proteínas, concentração do mosto pela evaporação da água, formação de substâncias que influenciam a cor e sabor (como melanoidinas), isomerização de substâncias amargas de lúpulo, esterilização do mosto e inativação enzimática. Posto isto, realiza-se a filtração e clarificação do mosto, a fim de serem removidos resíduos insolúveis, como as cascas dos cereais e resíduos de lúpulo (Wunderlich & Back, 2009).

Segue-se o processo de fermentação, que consiste na adição da levedura ao mosto, no fermentador, verificando-se a conversão dos açúcares em álcool etílico e dióxido de carbono (CO₂) (Wunderlich & Back, 2009). Este processo é influenciado por vários fatores, tais como a temperatura, o pH, a agitação, a disponibilidade de açúcares e a quantidade de levedura que é inoculada (Vivian et al., 2016; Wunderlich & Back, 2009). Finalizada a fermentação, ocorre a maturação, que consiste no repouso da cerveja, permitindo a fermentação do extrato residual (promove a formação de CO₂), remoção de compostos indesejáveis (como diacetil, aldeídos e compostos de enxofre), bem como a estabilização dos sabores e aromas. Além disso, ocorre a clarificação da cerveja devido à sedimentação das leveduras (Wunderlich & Back, 2009). Por fim, procede-se ao enchimento da cerveja artesanal com o intuito de conservar a sua qualidade e dar uma aparência mais atraente ao produto final.

Realça-se que as cervejas industriais antes do enchimento, passam pelo processo de filtração e clarificação recorrendo à polivinilpirrolidona para remoção de compostos fenólicos, que quando presentes, reagem com proteínas causando turvação (Marques et al., 2017; Wunderlich & Back, 2009). Além disso, fazem uso de antioxidantes exógenos com o intuito de realçar o sabor (Marques et al., 2017).

Após o enchimento, as cervejas industriais podem passar por um processo de pasteurização, para aumentar a sua estabilidade microbiológica (Wunderlich & Back, 2009). Por sua vez, as cervejas artesanais sendo um produto diferenciador, não utilizam aditivos e, habitualmente, não são filtradas nem pasteurizadas (Capece et al., 2018; Marques et al., 2017).

1.3. Estilos de Cerveja

As cervejas categorizam-se, principalmente, com base no processo de fermentação, dividindo-se, desta forma, em cervejas do tipo Ale, Lager (Figura 4) e cervejas de fermentação autónoma. Além disso, as cervejas podem diferir em vários aspetos como na coloração, aroma, amargor, extrato primitivo (concentração específica de açúcares no mosto) e teor alcoólico (Rodhouse & Carbonero, 2019).

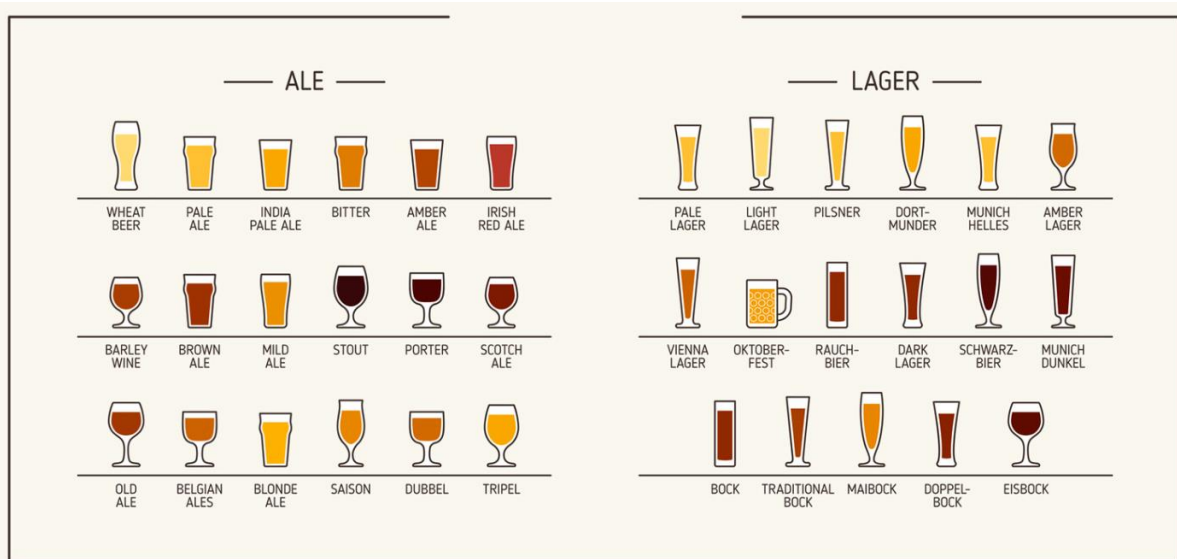


Figura 4. Principais estilos de cerveja artesanal (Cervejeiros de Portugal, n.d.).

Nas cervejas Ale, utiliza-se, tipicamente, estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ocorrendo a fermentação a temperaturas relativamente elevadas, que segundo Breda et al. (2022) variam entre 15 °C e 25 °C. Após a fermentação a levedura sobe à superfície da cerveja, no fermentador, o que lhe confere uma maior variedade de aromas e sabores, sendo uma cerveja mais encorpada e vigorosa. Deste tipo de fermentação surge uma vasta variedade de cervejas, tais como a India Pale Ale, a Barley wine e a Triple (Cervejeiros de Portugal, n.d.).

Nas cervejas Lager, a fermentação ocorre a temperaturas mais baixas, que segundo Breda et al. (2022) variam entre 5 °C e 10 °C, sendo utilizada, habitualmente, a estirpe de levedura *S. pastorianus*, também designada de *S. carlsbergensis*. Após a fermentação, as leveduras depositam-se no fundo do fermentador, o que confere à cerveja um sabor leve e limpo (ausência de aroma frutado/floral derivado do éster etílico). Desta forma, este é o tipo de cerveja mais

produzido, podendo destacar-se a Pilsner, a Vienna Lager e a Bock (Cervejeiros de Portugal, n.d.; Krogerus et al., 2015; Rodhouse & Carbonero, 2019).

Por sua vez, as cervejas de fermentação autónoma, embora menos comuns, caracterizam-se pela inexistência de inoculação de uma estirpe de levedura, ou seja, a fermentação ocorre naturalmente devido a leveduras e bactérias presentes no ar e nos barris de carvalho onde a cerveja é fermentada e envelhecida (Keersmaecker, 1996; Rodhouse & Carbonero, 2019). Este tipo de fermentação confere notas frutadas e ácidas à cerveja, tornando-a complexa e única. Deste tipo de fermentação surgem cervejas como a Lambic, a Gueuze e a Flanders Red Ale (Keersmaecker, 1996).

1.4. Composição da Cerveja

A cerveja possui uma grande variedade de compostos, que derivam diretamente das matérias-primas ou surgem durante o processo de produção. A água é o principal ingrediente da cerveja, representando mais de 90% da sua composição, pelo que o seu conteúdo mineral possui uma elevada influência no produto final (Buiatti, 2008; Quesada-Molina et al., 2019). Os compostos inorgânicos, nomeadamente, cálcio, magnésio, potássio, sódio, cloreto, sulfato, nitrato e fosfato, provêm da água da fermentação e do malte, e têm influencia na qualidade da cerveja (Buiatti, 2008).

O malte é a principal fonte de compostos proteicos, lípidos, hidratos de carbono e polifenóis, sendo responsável pelo sabor, aroma, cor e corpo da cerveja. Os compostos azotados incluem os aminoácidos, péptidos, polipéptidos, aminas e compostos heterocíclicos, tendo um valor estimado de 0,3-1,0 g/L. Os lípidos estão presentes na forma de ácidos gordos, digliceraldeídos e trigliceraldeídos (Buiatti, 2008). Por sua vez, os hidratos de carbono são o principal componente não volátil na cerveja (3,3-4,4%), e incluem 75-80% de dextrinas, 20-30% de monossacáridos e oligossacáridos e 5-8% de pentosanas. O malte também possui na sua constituição vitaminas hidrossolúveis, nomeadamente, vitamina B9 (folato), vitamina B12 (riboflavina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina) e vitamina B3 (niacina) (Quesada-Molina et al., 2019).

O lúpulo confere à cerveja o amargor e aroma que lhe é característico, contribui para a formação de espuma e protege a cerveja de contaminações por microrganismos (Quesada-Molina et al., 2019). Além disso, possui compostos que beneficiam a saúde, como resinas, óleos

essenciais e uma grande variedade de compostos fenólicos (Kobus-Cisowska et al., 2019). As resinas contêm humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos), sendo que os α -ácidos são isomerizados em iso- α -ácidos (iso-humulonas), que são os compostos amargos mais relevantes da cerveja. Por sua vez, os óleos essenciais conferem aroma à cerveja, compreendendo duas frações principais, ou seja, os hidrocarbonetos (70%) e uma fração de oxigênio (30%) (Buiatti, 2008; Kobus-Cisowska et al., 2019).

Os hidrocarbonetos dividem-se em hidrocarbonetos alifáticos, monoterpenos e sesquiterpenos. O mirceno (monoterpeno) e o humuleno, farneseno e cariofileno (sesquiterpenos) são os que existem em maior concentração (Kobus-Cisowska et al., 2019). Os compostos contendo oxigênio incluem ésteres, aldeídos e álcoois terpênicos (linalol e geraniol) (Buiatti, 2008).

Relativamente aos compostos fenólicos, estes derivam do malte (dois terços) e do lúpulo (um terço). Os compostos fenólicos presentes em maior concentração são os ácidos hidroxicinâmicos (o mais importante é o ácido ferúlico) e ácidos hidroxibenzóicos (por exemplo, ácido gálico) (Buiatti, 2008). Além disso, o lúpulo possui na sua constituição chalconas preniladas, nomeadamente, o xanthohumol e o desmetilxanthohumol, das quais se formam flavanonas isoméricas como isoxanthohumol e 8-prenilnaringenina (Figura 5) (Kobus-Cisowska et al., 2019; Tirado-Kulieva et al., 2023).

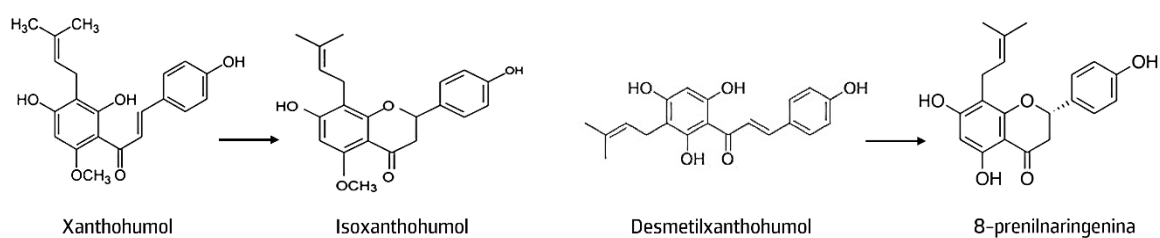


Figura 5. Principais chalconas preniladas e flavanonas isoméricas do lúpulo (Adaptado de Kolota et al. (2014) e Tirado-Kulieva et al. (2023)).

A tabela 2 resume alguns compostos fenólicos identificados em estudos realizados em diferentes países e com diferentes cervejas artesanais e industriais.

Tabela 2. Identificação de compostos fenólicos em cervejas artesanais e industriais.

País/Estilo Cerveja	Técnica	Compostos Fenólicos Identificados	Referência
Cerveja Artesanal			
Estados Unidos/SD	LC-QTOF-MS	Ácido benzóico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido clorogénico, catequina, esculina, hidroxicumarina, miricetina, naringina, quercetina e vanilina	(Anderson et al., 2021)
De Portugal/SD	RP-HPLC-DAD	Ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido trans-cinâmico catequina, epicatequina, galocatequina, kaempferol-3-O-glicósido, luteolina e quercetina	(Breda et al., 2022)
Itália/Ego, Alter, Triplo Malto, Ubi, Fiat Lux e Maior	HPLC-ESI-MS/MS	8-prenilnaringenina, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido trans-ferúlico, ácido trans- <i>p</i> -cumárico, ácido vanílico, catequina, cohumulona, colupulona, epicatequina, humulona, isoxantohumulol, lupulona, quercetina e xantohumulol	(Cortese et al., 2020)
Brasil/Witbier, Catharina Sour, Belgian Blond Ale, American IPA e Imperial Stout	HPLC-ESI-MS/MS	Ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido vanílico, catequina, epicatequina e seringaldeído	(Horn et al., 2021)
SD/Brown Porter, Classic American Pilsner, Irish Red Ale and American Pale Ale	HPLC-DAD	Ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido <i>p</i> -cumárico	(Marques et al., 2017)

Tabela 2. Identificação de compostos fenólicos em cervejas artesanais e industriais (continuação).

País/Estilo Cerveja	Técnica	Compostos Fenólicos Identificados	Referência
Cerveja Industrial			
Da Croácia, Alemanha e República Checa/SD	HPLC-PDA	Ácido cafeico, ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumárico e epicatequina	(Habschied, Lončarić, et al., 2020)
Da Sérvia, Holanda, Hungria, Eslovénia, Bélgica, Irlanda e Áustria/SD	HPLC-PDA	(-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido dihidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido protocatecuíco, ácido salicílico, ácido sinápico e ácido vanílico	(Mitić et al., 2014)
Brasil/American Brown Ale, American Pale Ale, Bock, Rauchbier, Schwarzbier, German Weizen, Premium American Lager, Standard American Lager e Sem álcool	HPLC- UV-Vis	Ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido benzóico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido siríngico e ácido vanílico	(Moura-Nunes et al., 2016)
Da China, Coreia do Sul, Holanda, México, Bélgica, EUA e Alemanha/SD	HPLC- <i>dual</i> λ <i>absorbance</i>	(-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido protocatecuíco, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido siríngico e ácido vanílico	(Zhao et al., 2010)

SD: Sem dados; LC-QTOF-MS: Espectrometria de massas em tandem de tempo de voo de cromatografia líquida-quadrupolo; RP-HPLC-DAD: Fase reversa - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção com arranjo de díodos; HPLC-ESI-MS/MS: HPLC- espectrometria de massa em tandem com ionização por *electrospray*; HPLC-DAD: HPLC com detecção por arranjo de díodos; HPLC-PDA: HPLC com um detetor de arranjo de fotodíodos; HPLC- UV-Vis: HPLC com detetor ultravioleta-visível; HPLC- *dual* λ *absorbance*: HPLC com detetor de absorbância dual λ .

A levedura utilizada na produção de cerveja é o microrganismo responsável pela fermentação, tendo um papel crucial na qualidade e no perfil sensorial da cerveja. Aquando da fermentação a levedura produz não só etanol e CO₂, mas também álcoois superiores (peso molecular superior ao etanol), ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos sulfurados. O teor alcoólico e o teor de CO₂ da maioria das cervejas produzidas varia entre 3,0% a 6,0%, e entre 3,5 a 4,5 g/L, respetivamente (Buiatti, 2008).

Os álcoois superiores presentes na cerveja são maioritariamente, o 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 2-metilpropanol, propanol e β-feniletanol. Destaca-se que o glicerol é classificado como álcool, sendo produzido durante a fermentação dos hidratos de carbono. Este possui um teor de 1,5 a 3,5 g/L, o que influencia o sabor e melhora a suavidade da cerveja (Buiatti, 2008).

Os ácidos orgânicos, são, essencialmente, subprodutos da metabolização excretados pelas leveduras, e contribuem para a acidez característica da cerveja. Os mais comuns na cerveja são o ácido acético, o ácido láctico e o ácido succínico (Buiatti, 2008).

Dado que todos os álcoois e ácidos presentes nas cervejas são suscetíveis de sofrer esterificação, a cerveja possui uma grande quantidade de ésteres (60–80 mg/L), sendo o acetato de etilo o mais comum. Os aldeídos derivam dos álcoois por desidrogenação, sendo o acetaldeído, o aldeído mais comum na cerveja. As cetonas também fazem parte da composição das cervejas, sendo produzidas a partir de metabolitos excretados pela levedura, sendo a cetona diacetil a mais importante, dado o aroma que confere a esta bebida (Buiatti, 2008).

Os compostos sulfurados podem estar no malte, e podem também advir do metabolismo ou de microrganismos que contaminam a cerveja. Deste modo, o dióxido de enxofre e o sulfeto de hidrogénio são os compostos voláteis de enxofre mais comuns na cerveja (Buiatti, 2008).

Assim sendo, constata-se que as cervejas podem diferir na sua composição, dada a grande variedade de compostos presentes nas matérias-primas utilizadas, bem como as condições a que as mesmas são sujeitas. Além disso, a utilização de matérias-primas de menor qualidade e mais baratas pode fazer com que as cervejas industriais tenham menor concentração de compostos benéficos à saúde, nomeadamente compostos fenólicos, quando comparadas às cervejas artesanais (Salant et al., 2020).

1.5. Cerveja como Bebida Funcional

A cerveja poderá ser considerada uma bebida funcional dado o seu valor nutritivo e o seu enriquecimento com ingredientes que possuem propriedades benéficas para a saúde do consumidor (Habschied, Živković, Živković, et al., 2020). Desta forma, as cervejeiras artesanais procuram produzir cervejas inovadoras, com ingredientes funcionais e com foco na sustentabilidade (Bharat Helkar & Sahoo, 2016; Olajire, 2012). A possibilidade de incorporação de ingredientes funcionais na cerveja artesanal é infinita, destacando-se a incorporação de plantas medicinais, algas, própolis, frutos, probióticos e fungos.

1.5.1. Incorporação de Plantas Medicinais e de Frutos na Cerveja

Bustos et al. (2019) estudaram a adição de folhas secas da planta *Parastrephia lucida* à cerveja, durante a maturação. A concentração de compostos bioativos, nomeadamente, flavonóis, flavanonas, flavonas e ácidos fenólicos, transferidos para a cerveja aumentou face à concentração de *P. lucida* adicionada (0,1, 0,5, 1 e 5% m/V), traduzindo-se numa maior atividade antioxidante da cerveja. A adição de 5% m/V da *P. lucida* aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade antioxidante comparativamente à cerveja controlo. Assim, no ensaio do poder redutor do ferro (FRAP) observou-se um valor expresso em equivalentes de Trolox (TE)/L, de $5,46 \pm 0,04$ mmol TE/L em comparação com $1,88 \pm 0,05$ mmol TE/L do controlo; no ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) obteve-se o valor de $3,34 \pm 0,11$ mmol TE/L em comparação com $1,15 \pm 0,10$ mmol TE/L do controlo; e no ensaio de capacidade de absorção dos radicais de oxigénio (ORAC) observou-se o valor de $30,58 \pm 1,20$ mmol TE/L face ao valor de $7,86 \pm 0,14$ mmol TE/L do controlo (Bustos et al., 2019).

Também no estudo de Ducruet et al. (2017) a incorporação das bagas de goji (50 g/L), em diferentes etapas do processo de produção de cerveja (adição ao mosto, fermentação e enchimento), permitiu a extração de uma elevada concentração de compostos bioativos. A adição das bagas de goji ao mosto foi a etapa que resultou no maior aumento da atividade antioxidante, variando de 60% a quase 80%, e conferiu as melhores características sensoriais à cerveja, incluindo cor intensa e sabor a caramelo e café. As bagas de goji têm propriedades antienvhecimento, hepatoprotetoras e estão associadas a um aumento da imunidade, face à elevada concentração de compostos bioativos, como polissacáridos e carotenóides, pelo que a sua incorporação na cerveja revelou-se promissora (Ducruet et al., 2017).

Nedyalkov et al. (2022) estudaram a adição de mirtilos à cerveja (167 g/dm³), durante a maturação, por serem frutos ricos em compostos fenólicos, nomeadamente antocianidinas (flavonoides) e ácidos fenólicos, conferindo à cerveja atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimutagénica e hepatoprotetora (Nedyalkov et al., 2022; Thilagavathi et al., 2023). A incorporação resultou num aumento das concentrações de ácidos fenólicos e de flavonoides, traduzindo-se num aumento do perfil fenólico e na melhoria das características organoléticas da cerveja (Nedyalkov et al., 2022).

Kim et al. (2017) analisaram a influência da incorporação da pimenta-verde (*Capsicum annum* L., a 30, 60 e 100 g) no potencial antioxidante e outras características físico-químicas da cerveja. A adição do fruto aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante, mantendo a aceitabilidade da cerveja, sem afetar as suas propriedades químicas básicas (Kim et al., 2017).

Num outro estudo, Zapata et al. (2019) utilizaram o marmelo (*Cydonia oblonga* Miller, a 5, 10 e 15%), um fruto rico em compostos bioativos, para melhorar o perfil sensorial e funcional da cerveja. Observou-se um aumento do teor de fenólicos totais (TPC), do total de ácidos hidroxicínâmicos e, mais especificamente, um aumento do teor de ácido clorogénico e ácido 3,5-dicafeoilquínico (Zapata et al., 2019).

A cereja-doce (*Prunus avium* L.) é um fruto muito apreciado pelo seu sabor, aroma e cor, bem como pelos seus valores e propriedades nutricionais (A. Gonçalves et al., 2021). A cerejeira pode ser encontrada em diversas regiões do mundo, principalmente em zonas de climas temperados e mediterrânicos. Em Portugal, os pomares de cerejeiras encontram-se essencialmente, a norte do rio Tejo, em particular nas regiões de Entre Douro e Minho (Resende), Beira Interior (Fundão, Covilhã e Belmonte) e Trás-os-Montes e Alto Douro (Lamego) (Nunes et al., 2022; Rodrigues et al., 2020; Serra et al., 2011). A região norte (em particular Resende e Lamego) é considerada uma região tradicional portuguesa produtora de cereja, na qual a área de cultivo aumentou nos últimos anos com a plantação de novos pomares (Rodrigues et al., 2020). As condições climáticas, as características do solo e a forma de cultivo conferem uma qualidade e sabor particulares, com uma elevada procura nacional e internacional. Algumas variedades são consideradas as mais representativas e com maior impacto comercial na região, como a “Durona”, “Lapins”, “Summit” e “Van” (Rodrigues et al., 2020) (Figura 6). A variedade “Lapins” é considerada a variedade de cereja-doce mais plantada em todo o mundo, sendo o seu fruto de elevada qualidade, e produzindo algumas das maiores e mais suculentas cerejas-doces (Pereira et al., 2020).

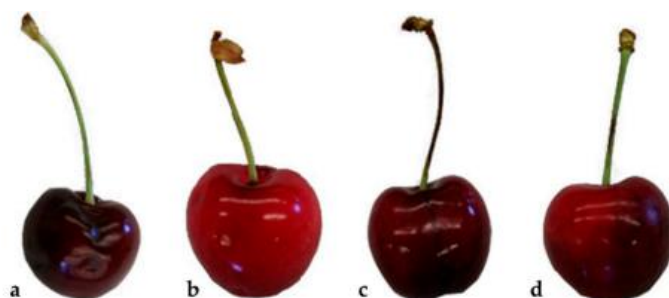


Figura 6. Variedades de cereja-doce: (a) Durona, (b) Lapins; (c) Summit; (d) Van (Rodrigues et al., 2020).

A cereja-doce é rica numa variedade de compostos bioativos, incluindo flavonoides (ex: antocianinas), ácidos fenólicos, vitaminas hidrossolúveis (C, B) e vitaminas lipossolúveis (A, E e K), que conferem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antitumorais, nomeadamente, no carcinoma hepatocelular (A. Gonçalves et al., 2021; Hu et al., 2021; Nedyalkov et al., 2023; Saeed et al., 2023). A tabela seguinte (Tabela 3) identifica o TPC (mg/100 g peso fresco) na variedade “Lapins” (Usenik et al., 2008).

Tabela 3. Teor de compostos fenólicos (mg/100 g peso fresco) na variedade “Lapins” (Usenik et al., 2008).

Grupo/Subgrupo	Compostos Fenólicos	Variedade “Lapins” mg/100 g de peso fresco
Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido neoclorogénico	8,70 ± 0,88
	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico	0,77 ± 0,06
	Ácido clorogénico	1,69 ± 0,15
Flavan-3-óis	Epicatequina	0,43 ± 0,09
Flavonóis	Rutina	2,06 ± 0,28
Antocianinas	Cianidina-3- <i>O</i> -glicósido	2,58 ± 0,08
	Cianidina-3- <i>O</i> -rutinósido	88,71 ± 0,73
	Pelargonidina-3- <i>O</i> -rutinósido	7,59 ± 0,70
	Peonidina-3- <i>O</i> -rutinósido	1,12 ± 0,02

De modo geral, a atividade antioxidante e o TPC estão relacionados entre si, e dependem da variedade estudada e dos fatores climáticos. Desta forma, alguns estudos têm avaliado a adição da cereja à cerveja (Nardini & Garaguso, 2020; Nedyalkov et al., 2023).

No estudo de Nedyalkov et al. (2023) avaliaram o efeito da adição de suco e bagaço de cereja-doce nas mesmas concentrações (15% (m/V)), em diferentes momentos da fermentação, face aos aspetos físico-químicos, propriedades antioxidantes e sensoriais da cerveja. A adição de suco e bagaço de cereja-doce à cerveja resultou na diminuição significativa da concentração de proteínas ($p < 0,05$), entre 3 a 4 vezes e 8 a 18 vezes, respetivamente. Esta diminuição é justificada pelo aumento do TPC que leva à precipitação das proteínas. Além disso, a adição de cereja-doce resultou no aumento do TPC, com valores para o suco de 9 a 11% superiores ao controlo e valores para o bagaço de 20 a 25% superiores ao controlo. A adição de suco e bagaço de cereja-doce levou ao aparecimento de notas frutadas e ao aumento da atividade antioxidante das amostras de cerveja, verificando-se o aumento mais significativo com a utilização de bagaço ($p < 0,05$) (Nedyalkov et al., 2023).

No estudo de Nardini e Garaguso (2020) avaliou-se o TPC, o teor de flavonoides totais (TFC), a atividade antioxidante e o perfil fenólico, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da incorporação de oito frutos, nomeadamente cereja-doce, na cerveja aquando da primeira etapa de fermentação. A incorporação de 300 g/L da cereja-doce variedade "Griotta" (cerveja 1) e de 200 g/L das variedades "Corniolo", "Ravenna" e "Graffione" (cerveja 2) aquando da produção de cervejas do tipo Ale, resultou numa melhoria das características da cerveja final face às cervejas industriais analisadas. O valor do TPC e do TFC da cerveja 1 foi de 767 ± 13 equivalentes de ácido gálico (GAE) mg/L e $221,8 \pm 3,3$ expresso em equivalentes de quercetina (QE) mg/L; e da cerveja 2 foi de 747 ± 8 mg GAE/L e $196,4 \pm 1,9$ mg QE/L, respetivamente. Em comparação, o valor do TPC e do TFC das cervejas industriais do tipo Ale variou entre 383 ± 7 mg GAE/L – 482 ± 10 mg GAE/L, e $51,9 \pm 1,1$ mg QE/L – $73,2 \pm 0,6$ mg QE/L, respetivamente. No ensaio antioxidante do ABTS o valor obtido na cerveja 1 ($3,53 \pm 0,06$ mM TE/L) foi superior ao obtido na cerveja 2 ($3,41 \pm 0,10$ mM TE/L), sendo ambos superiores às cervejas industriais do tipo Ale, com valores de ABTS a variar entre $1,55 \pm 0,02$ mM TE/L e $2,03 \pm 0,04$ mM TE/L. No ensaio do FRAP a cerveja 1 também demonstrou possuir maior capacidade antioxidante face à cerveja 2 ($9,76 \pm 0,11$ mM FeSO₄/L e $8,55 \pm 0,04$ mM FeSO₄ /L, respetivamente), sendo ambas superiores às cervejas industriais do tipo Ale (valores do FRAP a variar entre $3,38 \pm 0,04$ mM FeSO₄ /L e $4,39 \pm 0,18$ mM FeSO₄ /L) (Nardini & Garaguso, 2020).

1.5.2. Incorporação de Probióticos na Cerveja

Os probióticos definem-se como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Mack, 2005). Vários estudos têm averiguado a possibilidade dos probióticos serem incorporados na cerveja artesanal, dada a sua capacidade de ajudarem na manutenção da microbiota intestinal e num sistema imunológico saudável (Canonico et al., 2021; Capece et al., 2018; Chan et al., 2019; Mulero-Cerezo et al., 2019). A tabela 4 apresenta alguns dos microrganismos mais comuns estudados quanto às propriedades probióticas.

Tabela 4. Microrganismos mais comuns estudados quanto às propriedades probióticas.

	Presente classificação científica/basiónimo ou sinónimo homotípico	Referências
Lactobacilos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> / <i>Bacillus acidophilus</i>	
	<i>Lacticaseibacillus casei</i> / <i>Lactobacillus casei</i>	(Calumba et al.,
	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> / <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2021; Chan et
	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>	al., 2019; Dysvik
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> / <i>Lactobacillus plantarum</i>	et al., 2020;
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus fermentum</i>	Haffner & Pasc,
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2018;
	<i>Lactobacillus helveticus</i> / <i>Thermobacterium helveticum</i>	Herkenhoff et
	<i>Companilactobacillus farciminis</i> / <i>Lactobacillus farciminis</i>	al., 2023;
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Mitropoulou et
	<i>Levilactobacillus brevis</i> / <i>Lactobacillus brevis</i>	al., 2013; Nyhan
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	et al., 2023;
	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> / <i>Lactobacillus salivarius</i>	Praia et al.,
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	2022; L. C. Silva	
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> / <i>Lactobacillus paracasei</i>	et al., 2021)	
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> / <i>Lactobacillus buchneri</i>		
Bifidobactérias	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
	<i>Bifidobacterium breve</i>	
	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> / <i>Bifidobacterium infantis</i>	(Mitropoulou et
	<i>Bifidobacterium longum</i>	al., 2013; Tan et
	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> / <i>Bifidobacterium lactis</i>	al., 2023)
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	
<i>Bifidobacterium animalis</i>		

Tabela 4. Microrganismos mais comuns estudados quanto às propriedades probióticas (continuação).

	Presente classificação científica/basiônimo ou sinónimo homotípico	Referências
Outras Bactérias	<i>Enterococcus faecium</i> / <i>Streptococcus faecium</i>	(Mitropoulou et al., 2013; Tan et al., 2023)
	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	
	<i>Lactococcus lactis</i> / <i>Bacterium lactis</i>	
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> / <i>Propionicibacterium freudenreichii</i>	
	<i>Shouchella clausii</i> / <i>Bacillus clausii</i>	
	<i>Bacillus oligonitrophilis</i>	
Leveduras	<i>Saccharomyces boulardii</i>	(Canonico et al., 2021; Mitropoulou et al., 2013; Nyhan et al., 2023)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Mycoderma cerevisiae</i>	
	<i>Lachancea fermentati</i> / <i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	
	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i>	
	<i>Lachancea thermotolerans</i> / <i>Zygosaccharomyces thermotolerans</i>	
	<i>Monosporozyma unispora</i> / <i>Kazachstania unispora</i>	

A co-fermentação de *S. cerevisiae* S-04 com a bactéria *Lactobacillus paracasei* L26 na produção de cerveja artesanal demonstrou ser promissora, mantendo elevadas contagens de células viáveis (acima de 8 log UFC/mL), o que pode oferecer potenciais benefícios à saúde (Chan et al., 2019). No estudo de Capece et al. (2018) a incorporação da levedura *S. cerevisiae* var. *boulardii* revelou ser eficaz, resultando num elevado número de células viáveis (variando entre 8×10^6 e $7,0 \times 10^7$ UFC/mL), bem como no aumento da atividade antioxidante e do teor de polifenóis na cerveja artesanal, sem comprometer o aroma da cerveja. Por sua vez, o estudo de Mulero-Cerezo et al. (2019) demonstrou que a cerveja artesanal produzida com levedura *S. boulardii* em comparação com a cerveja artesanal produzida com levedura *S. cerevisiae* apresenta maior viabilidade da levedura ($8,3 \pm 1,4 \times 10^4$ e $1,1 \pm 0,2 \times 10^5$ UFC/mL, respetivamente), menor teor alcoólico (1,65 e 2,39, respetivamente), e maior acidificação (pH significativamente mais baixo, $p < 0,05$), o que é positivo, pois reduz riscos de contaminação na produção em larga escala.

No estudo de Canonico et al. (2021) a levedura probiótica *L. thermotolerans* provocou um aumento das notas aromáticas, nomeadamente notas ácidas e frutadas na cerveja artesanal. Assim, *L. thermotolerans* tem aplicabilidade na produção de cervejas ácidas, uma vez que tem a capacidade de produzir altas quantidades de ácido láctico a partir dos açúcares, o que permite a acidificação biológica natural durante a fermentação do mosto (Jesús Callejo et al., 2019; Salant et al., 2020).

É amplamente aceite que, para que um produto probiótico tenha efeitos benéficos, deve conter uma concentração mínima de 10^6 UFC/mL ou por grama (Kechagia et al., 2013). Além disso, é recomendado que o consumidor ingira diariamente entre 10^8 e 10^9 microrganismos probióticos para obter os benefícios esperados (Kechagia et al., 2013).

Em suma, dado ser crucial a incorporação de probióticos viáveis para que estes tenham a devida eficácia, as cervejas artesanais não filtradas e não pasteurizadas são mais adequadas do que as cervejas industriais, uma vez que as tecnologias aplicadas às últimas podem colocar em causa a viabilidade dos probióticos (Capece et al., 2018).

1.5.3. Incorporação de Outros Ingredientes Funcionais na Cerveja

Outros ingredientes têm vindo a ser adicionados à cerveja, com o objetivo de melhorar o produto final, como por exemplo, as algas, os cogumelos e a própolis (Cirlincione et al., 2023; Leskosek-Cukalovic et al., 2010; Ulloa et al., 2017).

As algas são consumidas há anos, em várias partes do mundo, como alimentos, suplementos alimentares e aditivos, face às suas propriedades organolépticas únicas e benefícios nutricionais e de saúde (Mendes et al., 2022). Okechukwu et al. (2022) estudaram a adição de pó de *Chlorella vulgaris* (3,3, 5 e 10 g/L) no processo de fermentação da cerveja. A *C. vulgaris* é uma microalga com diversos compostos bioativos, nomeadamente carotenos, vitaminas, aminoácidos essenciais, polissacáridos e clorofila, que possuem atividades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antitumorais e hepatoprotetoras na saúde humana. A adição de 10 g/L de *C. vulgaris* aumentou significativamente a concentração de polifenóis totais ($442,02 \pm 15,20$ mg GAE/L face a $257,8 \pm 30,40$ mg GAE/L do controlo) ($p < 0,05$), de TFC ($242,7 \pm 16,04$ mg QE/L face a $185,3 \pm 25,70$ mg QE/L do controlo), e a atividade de neutralização do H_2O_2 ($89,98 \pm 0,04\%$ em comparação com $88,86 \pm 0,13\%$ do controlo) na cerveja. Por sua vez, as características sensoriais não apresentaram diferenças significativas entre a cerveja com *C. vulgaris* e na cerveja utilizada como controlo (Okechukwu et al., 2022).

A própolis consiste num produto natural com um grande potencial como aditivo alimentar funcional face à diversidade de compostos bioativos com muitas propriedades funcionais (ex: antioxidante, antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória, antivírica e antifúngica) (Kujumgiev et al., 1999; Valencia et al., 2012). Ulloa et al. (2017) estudaram a adição de extrato etanólico de própolis à cerveja, durante a maturação a frio, nas concentrações de 0,05, 0,15 e 0,25

g/L. A adição do extrato etanólico de própolis à cerveja resultou no aumento do TPC com valores de 253,0 a 306,5 mg GAE/L, comparativamente a 242 mg GAE/L no controlo, e no aumento do TFC com valores de 16,0%, 49,7% e 59,2% acima do controlo (16,9 mg de QE/L). Por sua vez, o ensaio do FRAP revelou um aumento na atividade antioxidante dependente do aumento da concentração de extrato adicionado, obtendo-se valores de 1555, 1705 e 1892 μ mol de TE/L, para as três concentrações estudadas. Assim sendo, a incorporação do extrato etanólico de própolis na cerveja revelou ser promissora no aumento dos compostos bioativos e da atividade antioxidante da cerveja, sem influenciar os parâmetros físico-químicos (Ulloa et al., 2017).

Os cogumelos são conhecidos não apenas pelo seu elevado valor nutricional, mas também pelo sabor peculiar e aroma, face à presença de compostos aromáticos (Sun et al., 2020). No estudo de Leskosek-Cukalovic et al. (2010) avaliaram a incorporação, à cerveja engarrafa, de extrato alcoólico de *Ganoderma lucidum*, na concentração de 0,1–1,5 mL/L. A espécie *G. lucidum* consiste num cogumelo com propriedades antioxidantes, imunomoduladores e antitumorais, sendo utilizado na prevenção e tratamento de patologias como hepatite, hipertensão e diabetes (Leskosek-Cukalovic et al., 2010; Zhou et al., 2007). A incorporação do extrato demonstrou potencial para melhorar as propriedades funcionais da cerveja, devido à presença de triterpenos e ácidos gordos. Além disso, permitiu a produção de uma cerveja considerada sensorialmente aceitável, destacando-se a melhoria, por exemplo, do sabor (Leskosek-Cukalovic et al., 2010). Num outro estudo, realizado por Cirlincione et al. (2023), a adição de duas quantidades diferentes (5 e 10 g/L) de *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* em pó, em diferentes fases de produção da cerveja artesanal (pré e pós fermentação alcoólica) demonstrou uma melhoria na viabilidade da levedura durante a fermentação alcoólica, assim como um aumento no teor alcoólico e um melhor perfil sensorial.

Além da adição de ingredientes funcionais à cerveja, também tem sido alvo de estudos a utilização de outros ingredientes, por exemplo, para a obtenção de cervejas sem glúten, para que possam ser consumidas por pessoas intolerantes às proteínas do glúten encontradas na cevada e no trigo (Mayer et al., 2015; Salant et al., 2020). No estudo de Mayer et al. (2015) foram produzidas cervejas de malte de arroz, um cereal sem glúten e facilmente disponível. As cervejas apresentaram um perfil sensorial semelhante ao de uma cerveja de malte de cevada, em termos de aroma, sabor e sensação na boca, mas mais insípido. No entanto, o perfil sensorial pode ser melhorado por temperaturas de secagem mais altas do malte de arroz ou por meio de uma estirpe de levedura, variedade de lúpulo ou diferentes proporções de ingredientes (Mayer et al., 2015).

1.6. Atividade Antioxidante e Hepatoprotetora da Cerveja e Matérias-primas

Nos últimos anos, o interesse nutricional da cerveja tem vindo a aumentar face à sua riqueza em compostos antioxidantes. Os antioxidantes apresentam efeitos biológicos benéficos, prevenindo o stress oxidativo, resultante da produção excessiva de ROS/RNS, e reduzindo os danos oxidativos a nível celular (Martinez-Gomez et al., 2020).

As espécies reativas consistem em radicais livres (como o superóxido, hidroxilo, peróxido), assim como intermediários reativos não radicalares (como o H_2O_2) (Martinez-Gomez et al., 2020). Os radicais livres são produzidos sob condições fisiológicas normais no nosso organismo, sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico, mas a sua produção aumenta em condições patológicas, podendo resultar em stress oxidativo (Koren et al., 2019). Os antioxidantes podem atuar de diferentes formas, como por exemplo, eliminando radicais livres, inibindo enzimas pro-oxidativas, ou quelando metais pesados (Koren et al., 2019).

O radical superóxido não é tão reativo e pode não causar danos diretos às células. No entanto, o seu produto de reação, o H_2O_2 , na presença de vestígios de iões metálicos como o Fe^{2+} (ião ferroso), é convertido em radicais hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que por sua vez podem oxidar a maioria das biomoléculas (Phaniendra et al., 2015). Os substratos orgânicos ou lípidos, após reagirem com $\cdot\text{OH}$, na presença de oxigénio, são convertidos em radicais peróxido ($\text{ROO}\cdot$)/($\text{LOO}\cdot$), originando reações em cadeia, e multiplicando o dano. Desta forma, os radicais livres formados podem induzir alterações a nível dos lípidos das membranas, do ADN (ácido desoxirribonucleico) e proteínas, podendo levar à morte celular (Martinez-Gomez et al., 2020) (Figura 7).

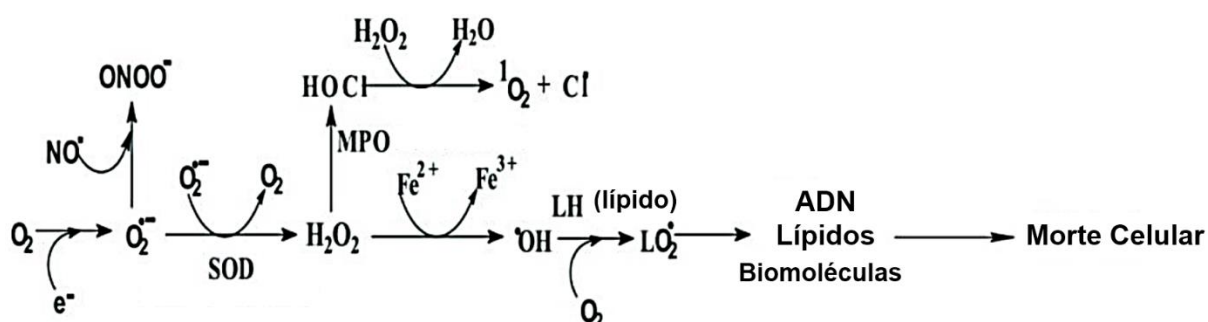


Figura 7. Alterações resultantes das espécies reativas de oxigénio e de azoto (Adaptado de (Martinez-Gomez et al., 2020; Priyadarsini, 2005)). O_2 – oxigénio; e^- – eletrão; $\text{O}_2^{\cdot-}$ – radical superóxido; ONOO^- – radical peroxinitrito; $\text{NO}\cdot$ – radical óxido nítrico; SOD – superóxido dismutase; H_2O_2 – peróxido de hidrogénio; MPO – Mieloperoxidase; HOCl – ácido hipocloroso; H_2O – água; $^1\text{O}_2$ oxigénio singleto; Cl^- – Cloro; Fe^{2+} – ião ferroso; Fe^{3+} – ião férrico; LH – Lípidos; $\cdot\text{OH}$ – radical hidroxilo; $\text{LO}_2\cdot$ – radicais peróxido; ADN – ácido desoxirribonucleico.

Desta forma, o consumo de alimentos ou bebidas com potencial antioxidante, ou o aumento das atividades antioxidantes dos produtos (por exemplo, através da incorporação de outros ingredientes ativos), constitui uma maneira eficaz de melhorar a saúde humana (D. Yang & Gao, 2021).

Existem evidências suficientes para mostrar a proteção antioxidante e os efeitos na saúde dos compostos fenólicos presentes na cerveja. Sabe-se que os compostos fenólicos apresentam uma atividade antioxidante mais forte do que as vitaminas (D. Yang & Gao, 2021). No entanto, outros ingredientes não alcoólicos da cerveja, como melanoidinas, vitaminas B6, B12, C e E, e o selênio são também considerados bons antioxidantes (Rodrigo et al., 2015; D. Yang & Gao, 2021).

No estudo de S. Silva et al. (2022), determinaram o TPC e a atividade antioxidante de cervejas artesanais portuguesas e das matérias-primas utilizadas na sua produção, nomeadamente lúpulo e malte. As cervejas artesanais apresentaram um TPC que variou entre 343,78 mg GAE/L e 2172,49 mg GAE/L, comparativamente a $255,3 \pm 69,6$ mg GAE/L e $394,0 \pm 48,7$ mg GAE/L das cervejas industriais. Além disso, a determinação da capacidade antioxidante das cervejas artesanais pelo ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) revelou capacidade de inibição do radical, com valores entre $58,3 \pm 1,1\%$ e $99,4 \pm 0,6\%$, comparativamente a $85,7 \pm 2,1\%$ e $70,4 \pm 0,7\%$ das cervejas industriais. Quanto às matérias-primas, a inibição de DPPH variou de 36,5% a 96,0% para amostras de malte e 64,7% a 79,6% nas amostras de lúpulo. Assim sendo, as cervejas artesanais revelaram ter maior capacidade antioxidante do que as matérias-primas isoladas e maior TPC que as cervejas industriais (S. Silva et al., 2022).

O fígado é o principal local de metabolização do álcool, pelo que é particularmente suscetível a lesões provocadas pelos subprodutos resultantes desse processo, nomeadamente acetaldeído e ROS (Hyun et al., 2021). Os efeitos nocivos do consumo excessivo de álcool estão bem descritos, ou seja, bebidas com alto teor alcoólico não são boas para a saúde humana (Kerpes et al., 2017; Oak et al., 2018). No entanto, o efeito de uma quantidade intermédia de bebida alcoólica é mais complexo e precisa de mais estudos (Olas, 2020). Por exemplo, a cerveja artesanal quando consumida com moderação (12 g/dia de etanol para as mulheres e 24 g/dia de etanol para os homens), tem a capacidade de conferir benefícios à saúde e minimizar os efeitos prejudiciais associados ao álcool (Boronat et al., 2020; Gaetano et al., 2016). Esta questão envolve os possíveis efeitos dos probióticos associados com ingredientes não alcoólicos em bebidas, como a cerveja. Além disso, a cerveja possui na sua composição constituintes que conferem atividade antioxidante (Boronat et al., 2020; Gaetano et al., 2016).

Embora escassos, existem estudos que demonstram propriedades hepatoprotetoras dos compostos bioativos e matérias-primas da cerveja (Dorn et al., 2010; Ferk et al., 2010; Park et al., 2021; Pinto et al., 2012; Y.-H. Lee et al., 2016). No estudo de Pinto et al. (2012), o xanthohumol, um dos principais flavonoides do lúpulo, preveniu o dano hepático induzido por tetracloreto de carbono (agente hepatotóxico) em ratos, dada a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica e proteger da degradação de enzimas antioxidantes, bem como possuir propriedades antioxidantes. Além disso, no estudo de Pinto et al. (2014), o xanthohumol também revelou capacidade para proteger contra danos oxidativos agudos induzidos pelo álcool, em ratos.

Num outro estudo, Dorn et al. (2010), observaram que xanthohumol inibiu a ativação das células estreladas hepáticas (principais mediadores da fibrose hepática) e induziu a sua apoptose, *in vitro*. Por sua vez, o xanthohumol reduziu a inflamação hepática e a expressão de genes pró-fibrogénicos, *in vivo*, em ratos (Dorn et al., 2010).

Ferk et al. (2010), num estudo realizado em ratos, verificaram que a suplementação de água com xanthohumol também revelou prevenir a formação e expansão clonal de focos pré-neoplásicos no fígado, bem como inibir a indução do dano ao ADN no tecido hepático.

Por fim, a cevada (*Hordeum vulgare*), ingrediente comum das cervejas artesanais, também revelou ter efeito hepatoprotetor, dada a sua composição em flavonoides, nomeadamente a saponarina (flavona) que possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Kantharaj et al., 2023; Y.-H. Lee et al., 2016; Park et al., 2021). Em estudos *in vivo*, realizados em ratos e também em humanos, a suplementação com brotos de cevada revelou ter efeito protetor das lesões hepáticas induzidas pelo álcool etílico, uma vez que reduziu a formação de ROS e a peroxidação lipídica, bem como revelou ter capacidade antioxidante e de inibição da resposta inflamatória induzida pelo etanol (Y.-H. Lee et al., 2016; Park et al., 2021).

2. Objetivos

Assim, tendo em conta os seguintes pressupostos:

- O aumento da produção e consumo de cerveja artesanal nos últimos anos;
- A escassez de estudos que avaliem atividades biológicas em cervejas artesanais (produto final) e após a incorporação de novos ingredientes ativos;
- A possibilidade de incorporar novos ingredientes ativos nas cervejas, com a melhoria de parâmetros como a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos.

O presente trabalho apresenta como objetivo geral:

- Avaliar a atividade antioxidante e a toxicidade hepática, *in vitro*, em cervejas artesanais portuguesas e espanholas.

E como objetivos específicos:

- Determinar os parâmetros físico-químicos das cervejas, antes e após incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins";
- Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, dos extratos (aquoso e etanólico) de cereja variedade "Lapins", assim como das cervejas antes e após incorporação dos extratos de cereja;
- Avaliar a toxicidade hepática, *in vitro*, das cervejas em células de hepatocarcinoma humano (HepG2);
- Avaliar o potencial hepatoprotetor, *in vitro*, das cervejas, antes e após a incorporação de extratos de cereja variedade "Lapins", contra o stress oxidativo induzido pelo *t*-BOOH em células HepG2.

3. Material e Métodos

3.1. Tipo de Estudo, Duração e Local de Realização

Trata-se de um estudo experimental, com início em setembro de 2023 e término em outubro de 2024. A componente experimental teve a duração de 9 meses (entre setembro de 2023 e maio de 2024), tendo sido realizada nas instalações do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, na Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto.

3.2. Reagentes

O ácido gálico (GA), *Folin-Ciocalteu*, ácido clorídrico e curcumina foram obtidos da empresa *Merck* (Darmstadt, Alemanha). O etanol absoluto, ácido acético glacial, hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de ferro (II), fosfato dissódico, cloreto de ferro III, acetato de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram obtidos da *VWR® Chemicals* (Ohio, EUA). A quercetina, ácido 3,5-dinitrosalicílico, tartarato de sódio e potássio, *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) e fosfato de potássio monobásico foram obtidos da *Sigma-Aldrich®* (St. Louis, EUA). O persulfato de potássio foi obtido da *Biochem* (Cosne-Cours-sur-Loire, França). O ABTS, a ferrozina e a solução de antibiótico e antimicótica a 1% foram obtidos da *Thermo Scientific* (Kandel, Alemanha). O fosfato monossódico foi obtido da *J. T. Baker®* (Deventer, Holanda). O dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de sódio, ácido ascórbico obtidos da empresa *Fisher Scientific* (Loughborough, Reino Unido). O brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) obtidos da empresa *Acros Organics* (Geel, Bélgica). O carbonato de sódio foi obtido da *Atom Scientific* (Manchester, Reino Unido). A glicose foi obtida da *Labkem* (Barcelona, Espanha). O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) foi obtido da TCI (Zwijndrecht, Bélgica). O peróxido de hidrogénio foi obtido da *PanReac AppliChem* (Barcelona, Espanha). Por sua vez, a tripsina, tampão fosfato-salino (PBS), e *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) foram obtidos da empresa *Corning* (Manassas, EUA). O soro fetal bovino (FBS) foi obtido da empresa *Biochrom KG* (Berlim, Alemanha).

3.3. Seleção e Preparação das Amostras

3.3.1. Cervejas Artesanais e Industriais

A seleção das cervejas artesanais e industriais foi realizada por conveniência, tendo sido adquiridas comercialmente ou cedidas pelas cervejeiras, um total de 11 cervejas, integrando nove estilos diferentes. Destas 11 cervejas, cinco são cervejas artesanais portuguesas, quatro são cervejas artesanais espanholas e duas são cervejas industriais portuguesas (Tabela 5).

Tabela 5. Características e codificação das cervejas selecionadas para o estudo.

Tipo	Codificação	Artesanal vs. Industrial	Estilo	País	Embalagem	Volume da embalagem (mL)	Fonte
Ale	BA-ET	Artesanal	Brown Ale	Espanha	Garrafa	330	Superfície comercial
	DB-ET	Artesanal	Dubble Belga	Espanha	Garrafa	330	Superfície comercial
	IS-ES*	Artesanal	Imperial Stout	Espanha	Garrafa	330	Superfície comercial
	PA-ET	Artesanal	Pale Ale	Espanha	Garrafa	330	Superfície comercial
	BP-N	Artesanal	Brown Porter	Portugal	Garrafa	330	Cervejeira
	IPA-N	Artesanal	India Pale Ale	Portugal	Garrafa	330	Cervejeira
	IS-N	Artesanal	Imperial Stout	Portugal	Garrafa	330	Cervejeira
	SS-SB**	Industrial	Sweet Stout	Portugal	Lata	330	Superfície comercial
Lager	L-N	Artesanal	Lager	Portugal	Garrafa	330	Cervejeira
	P-L	Artesanal	Pilsner	Portugal	Garrafa	330	Superfície comercial
	P-SB	Industrial	Pilsner	Portugal	Garrafa	200	Superfície comercial

*Contém grãos de café, madeira, *whisky*; ** Com açúcar e corante: E 150c

A preparação das cervejas em estudo teve por base o método descrito por Censi et al. (2021) e S. Silva et al. (2022). Resumidamente, procedeu-se à homogeneização do conteúdo de cada garrafa ou lata, e à sua desgaseificação por sonificação (Clifton; SW12H) durante 40 minutos, a 50 kHz, à temperatura ambiente no escuro. Seguiu-se a sua desalcoolização no evaporador rotativo (VWR®; Ika® RV8), com pressão reduzida (900 mbar), a 60 rpm e temperatura controlada (40 °C), durante 1 hora, e, posterior liofilização (LABCONCO®; FreeZone®), em condições de liofilização de 0,07 mbar, com uma temperatura da superfície do condensador de -72 °C por 3 dias e armazenamento a -80 °C.

Para os diferentes ensaios realizados, utilizou-se a amostra de cerveja liofilizada solubilizada em água destilada, a qual será denominada de cerveja em solvente aquoso, e utilizou-se a amostra de cerveja liofilizada solubilizada numa mistura hidroalcoólica composta por água destilada e etanol na mesma proporção da cerveja original, sendo denominada de cerveja em solvente etanólico, ao longo do trabalho.

3.3.2. Extratos de Cereja-Doce Variedade “Lapins”

Para a incorporação de um ingrediente na cerveja, optou-se (por conveniência) pelo fruto *P. avium* L. variedade “Lapins”, tendo este sido cedido por um produtor desta variedade de cereja em Resende (Portugal).

Para a preparação do fruto e obtenção dos extratos (aquoso e etanólico), seguiu-se o procedimento de Horincar et al. (2020) e Nizioł-Lukaszewska (2018), com modificações, onde as cerejas variedade “Lapins” foram descarossadas, desidratadas (AIGOSTAR®; 300005INI) até peso constante (por aproximadamente 96 horas), trituradas em moinho elétrico (Taurus®; Aromatic) (20-30 segundos) e armazenadas a -80 °C. Para a obtenção do extrato aquoso de cereja variedade “Lapins” (EAC), preparou-se uma infusão na proporção de 1:10 (cereja:água) e deixou-se repousar por 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. De seguida, procedeu-se à sua filtração por gravidade (papel de filtro Whatman, N.º 1) e posterior liofilização (LABCONCO®; FreeZone®), em condições de liofilização de 0,07 mbar, com uma temperatura da superfície do condensador de -72 °C por 3 dias, e armazenamento a -80 °C. Para obtenção do extrato etanólico de cereja variedade “Lapins” (EEC) adicionou-se 20 mL de etanol (proporção etanol:água de 70:30 (V/V)) a 1 g de cereja triturada e homogeneizou-se. A mistura foi colocada no banho de ultrassons (Clifton; SW12H) a 50 kHz, a temperatura 40 °C, durante 30 minutos e depois filtrada

por gravidade (papel de filtro Whatman, N.º 1). Realizaram-se três etapas de extração sucessivas e os filtrados obtidos foram colocados no evaporador rotativo (VWR®; Ika® RV8), com pressão reduzida (900 mbar), a 60 rpm e temperatura controlada (40 °C) (VWR®; Ika® HB10), até total evaporação do etanol. Posto isto, procedeu-se à liofilização da amostra (LABCONCO®; FreeZone®), em condições de liofilização de 0,07 mbar, com uma temperatura da superfície do condensador de -72 °C por 3 dias, e armazenamento a -80 °C.

A adição dos extratos de cereja variedade “Lapins” à cerveja artesanal teve por base o método descrito por Djordjevic et al. (2016), tendo sido efetuada em sala assética com câmara de fluxo laminar vertical (Telstar; EF/B TE), na concentração de 1 mg/mL de cerveja. Após a adição do extrato fechou-se a cerveja, ficando a maturar a temperatura controlada (8 °C) durante 24 horas. Posteriormente, procedeu-se à desgaseificação (Clifton; SW12H) durante 40 minutos, a 50 kHz, à temperatura ambiente no escuro. Seguiu-se a sua desalcoolização no evaporador rotativo (VWR®; Ika® RV8), com pressão reduzida (900 mbar), a 60 rpm e temperatura controlada (40 °C), durante 1 hora, e, posterior liofilização (LABCONCO®; FreeZone®), em condições de liofilização de 0,07 mbar, com uma temperatura da superfície do condensador de -72 °C por 3 dias, e armazenamento a -80 °C.

3.4. Parâmetros Físico-Químicos das Cervejas

3.4.1. Teor de álcool, cor e amargor

Os parâmetros relativos ao teor de álcool, cor e amargor não foram determinados, tendo sido disponibilizados pelas cervejeiras ou obtidos diretamente das embalagens das cervejas.

3.4.2. Determinação do pH

O pH foi medido em 50 mL das 11 cervejas que integraram o estudo e na cerveja com a incorporação do extrato aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins” (EAC e EEC, respetivamente), após a desgaseificação e desalcoolização inicial, utilizando-se um leitor de pH (Bante instruments; 900) calibrado.

3.4.3. Determinação da Acidez Total

A determinação da acidez total nas 11 cervejas que integraram o estudo e na cerveja com a incorporação do EAC e EEC teve por base o método de titulometria descrito por S. Silva et al. (2022), com ligeiras modificações. Resumidamente, realizou-se a titulação com um leitor de pH calibrado (Bante instruments; 900), medindo-se a quantidade de titulante, NaOH 0,1 M, necessária para elevar o pH para 8,2. A acidez total da cerveja foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Acidez Total (\% de ácido láctico)} = \frac{(\text{Volume de NaOH utilizado} \times 0,9)}{\text{Volume de titulado}}$$

3.4.4. Teor de Açúcares Redutores (TAR)

A determinação do TAR nas 11 cervejas que integraram o estudo e na cerveja com a incorporação do EAC e EEC teve por base o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por S. Silva et al. (2022), com ligeiras modificações. Resumidamente, dissolveu-se 1 g de DNS em 20 mL de NaOH (2 M) e adicionou-se 30 g de tartarato de sódio e potássio, sendo a mistura diluída em água destilada (1 L), para obtenção de uma solução de DNS (1%). Em seguida, 1 mL de amostra, água destilada (branco) ou de glicose numa gama variada de concentrações (50-1000 mg/L) foram misturados com 1 mL da solução de DNS (1%) e incubados a 100 °C (Memmert; w-270), no escuro, por 5 minutos, seguindo-se a incubação em banho de gelo por 5 minutos, no escuro. A absorvância foi determinada a 540 nm usando um espectrofotómetro UV-Vis (Jenway; 6300). Os valores de absorvância foram comparados com uma curva padrão de calibração de glicose, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de glicose (GE)/L de amostra.

3.5. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC)

A determinação do TPC nas 11 cervejas que integraram o estudo, no EAC, no EEC e na cerveja com a incorporação do EAC e EEC teve por base o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* descrito por S. Silva et al. (2022). Resumidamente, 250 µL de amostra (1 mg/mL), água destilada (branco) ou de GA numa gama variada de concentrações (5-100 µg/mL) foram

misturados com 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* (0,2 M) e incubados por 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram adicionados 2 mL da solução de carbonato de sódio (75 g/L), perfazendo-se o volume até 5 mL com água destilada. Após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente no escuro, determinou-se a absorvância a 760 nm usando um espectrofotómetro UV-Vis (Jenway; 6300). Os valores de absorvância foram comparados com uma curva padrão de calibração de GA, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de amostra.

3.6. Ensaio Atividade Antioxidante

3.6.1. Ensaio de Neutralização do Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

A atividade de neutralização do radical catiónico ABTS^{•+} foi determinada de acordo com o método descrito por Petrón et al. (2021), ligeiramente modificado. Resumidamente, dissolveu-se o ABTS em água destilada para obtenção de uma solução de ABTS 7,0 mM, e do persulfato de potássio em água destilada para obtenção de uma solução de 2,45 mM. Ambas as soluções foram misturadas e deixadas no escuro durante 16 horas à temperatura ambiente, para obtenção do radical ABTS^{•+}. Posto isto, diluiu-se a solução de ABTS^{•+} com PBS para obter uma absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. Por fim, adicionou-se 0,3 mL da amostra (cerveja, EAC, EEC e cerveja + extratos de cereja variedade "Lapins") ou de trolox (controlo-positivo), numa gama variada de concentrações (1-1000 µg/mL), ou de água destilada (branco) a 2,7 mL da solução de ABTS^{•+}. Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente no escuro, a absorvância foi medida a 734 nm usando um espectrofotómetro UV-Vis (Jenway; 6300), e a atividade de neutralização do radical ABTS^{•+} calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de ABTS}^{\bullet+} (\%) = \frac{(\text{Absorvância branco} - \text{Absorvância amostra})}{\text{Absorvância branco}} \times 100$$

O valor de IC₅₀ (concentração média inibitória), expresso em µg/mL, foi obtido utilizando o software *GraphPAD® Prism 8.0*.

3.6.2. Ensaio do Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂)

A capacidade de neutralização do H₂O₂ teve por base o método descrito por Bhatti et al. (2015), ligeiramente modificado. Resumidamente, adicionou-se 1 mL de amostra (cerveja, EAC, EEC e cerveja + extratos de cereja variedade "Lapins") ou de ácido ascórbico (controlo-positivo), numa gama variada de concentrações (1-1000 µg/mL), ou de água destilada (branco) a 3 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) e 1 mL da solução de H₂O₂ 40 mM. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente e no escuro, foi medida a absorvância a 230 nm usando um espectrofotómetro UV-Vis (Jenway; 6300). A atividade de neutralização do H₂O₂ foi calculada usando a fórmula:

$$\text{Neutralização de H}_2\text{O}_2(\%) = \frac{(\text{Absorvância branco} - \text{Absorvância amostra})}{\text{Absorvância branco}} \times 100$$

O valor de IC₅₀, expresso em µg/mL, foi obtido utilizando o *software GraphPAD® Prism 8.0*.

3.6.3. Ensaio do Poder Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP)

O ensaio do FRAP teve por base o método descrito por Censi et al. (2021) e Ulloa et al. (2017). Resumidamente, preparou-se o reagente FRAP adicionando 3 mL de cloreto de ferro III (20 mM) e 30 mL de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6) a 3 mL de uma solução TPTZ (10 mM) em ácido clorídrico (HCl) (40 mM). Posto isto, 80 µL de amostra (10 mg/mL) (cerveja, EAC, EEC e cerveja + extratos de cereja variedade "Lapins"), água ultrapura (branco) ou de trolox (controlo-positivo) numa gama variada de concentrações (25-900 µg/mL) foram misturados com 2,4 mL do reagente FRAP e incubados (Stuart; SI 500) durante 15 minutos a 37 °C e 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. A leitura da absorvância foi realizada a 593 nm usando um espectrofotómetro UV/VIS (Jenway; 6300). A capacidade redutora das amostras foi calculada com base na curva padrão de calibração do trolox, sendo os resultados expressos em µmol de equivalentes de trolox (TE)/g de amostra (µmol TE/g).

3.6.4. Atividade Quelante de Metais (MCA)

O ensaio da MCA, também designado de ensaio da ferrozina, teve por base o método descrito por S. Silva et al. (2022). Resumidamente, preparou-se uma placa de 96 poços adicionando-se 50 µL de amostra (cerveja, EAC, EEC e cerveja + extratos de cereja variedade “Lapins”) ou EDTA (controle-positivo), numa gama de concentrações (1-1000 µg/mL), e 50 µL de solução de sulfato ferroso (FeSO₄) 0,15 mM a cada poço, ficando em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. Seguidamente, adicionou-se 50 µL de ferrozina 0,5 mM, agitando-se, e repousando por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. A absorvância foi medida a 562 nm, utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific; Multiskan FC). A capacidade quelante das amostras foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Quelante (\%)} = \frac{(\text{Absorvância controle} - \text{Absorvância amostra})}{\text{Absorvância controle}} \times 100$$

O valor de IC₅₀, expresso em µg/mL, foi obtido utilizando o *software GraphPAD® Prism 8.0*.

3.7. Cultura Celular

3.7.1. Linha Celular e Condições de Cultura

Para os ensaios de cultura celular foram utilizadas células HepG2 (linha celular de carcinoma hepatocelular), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), mantendo-se a cultura em frascos de poliestireno de 25 cm² (Orange Scientific®) com MEM, contendo 10% de FBS e uma mistura de antibiótico-antimicótico (1%), sob uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C (Advantage-Lab; AL01-01-100). A subcultura realizou-se após observação, no microscópio ótico invertido (Nikon; Eclipse TE300), de 80% de confluência das células (ATCC, 2022). Todo o processo foi realizado em sala assética e numa câmara de fluxo laminar vertical (Telstar; EF/B TE).

3.7.2. Toxicidade Celular

Para estudar a citotoxicidade das cervejas, do EAC, do EEC e da cerveja após incorporação dos extratos de cereja, teve-se por base o método utilizado por Carvalho et al. (2014) e Viegas et

al. (2012), com ligeiras modificações. Resumidamente, as células HepG2 foram incubadas, sob uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C (Advantage-Lab; AL01-01-100), em placas de 96 poços (Orange Scientific®) com uma densidade de 2,0 × 10⁵ de células/poço, 48 horas antes da incubação com as amostras. As células foram depois tratadas com diferentes concentrações das amostras (1-500 µg/mL), em meio MEM por 24 e 48 horas (100 µL de volume final/poço) e a citotoxicidade foi estimada através do ensaio do MTT. Para tal, após o período de incubação, adicionou-se 10 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) aos poços e aguardou-se 1 hora numa atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C (Advantage-Lab; AL01-01-100). Após esse tempo, o meio foi removido e os cristais de formazano formados dissolvidos numa solução de DMSO:Etanol a 50:50 (V/V). A absorvância foi lida a 570 nm, usando um leitor de microplacas (Thermo Scientific; Multiskan FC). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controlo (células sem extrato) através da fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{(\text{Absorvância amostra})}{(\text{Absorvância controlo})} \times 100$$

3.7.3. Proteção das Amostras de Cerveja e Extratos de Cereja Contra a Toxicidade Induzida por *tert*-butil hidroperóxido em Células HepG2

Para estudar o potencial efeito protetor da cerveja, do EAC, do EEC e de cerveja após incorporação dos extratos de cereja, contra a toxicidade induzida pelo *t*-BOOH definiu-se, primeiramente, o tempo e concentração do tóxico a utilizar. Para tal, teve-se por base o método utilizado por Carvalho et al. (2014) e Lima et al. (2007), com ligeiras modificações. Resumidamente, as células HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços (Orange Scientific®), com uma densidade de 2,0 × 10⁵ células/poço (100 µL de volume final/poço), sob uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C (Advantage-Lab; AL01-01-100). Após 48h de incubação, o meio foi descartado e novo meio contendo o tóxico foi adicionado. Estimou-se a viabilidade celular, a diferentes tempos (1 hora, 2 horas, 3 horas), pelo ensaio do MTT.

Após a seleção da concentração e tempo de contacto do tóxico com as células HepG2, avaliou-se o efeito das amostras (cerveja, EAC e EEC, cerveja com incorporação de extratos de cereja variedade "Lapins") contra a toxicidade induzida pelo *t*-BOOH. Para tal, recorreu-se a dois regimes: 1) pré-incubação e 2) co-incubação. No regime de pré-incubação (1), as células HepG2

foram incubadas com as amostras, por 5 horas, seguindo-se um período de recuperação de 16 horas com meio de cultura novo (sem extratos). Posto isto, as células foram colocadas em contacto com o *t*-BOOH na concentração e tempo a determinar. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. A curcumina foi utilizada como controlo-positivo. No regime de co-incubação (2), as células foram incubadas, em simultâneo, com as amostras e o *t*-BOOH (na concentração e tempo a determinar), seguindo-se a determinação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT. A quercetina foi utilizada como controlo-positivo neste regime.

3.8. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão determinados de análises em triplicado. A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism*[®] 8.0. As diferenças significativas do ensaio do TPC e dos ensaios antioxidantes foram calculadas através do teste *t* de *Welche's*, ao comparar entre pares, e pela análise estatística da variância simples (ANOVA) com o teste de comparações múltiplas de *Sidak's*, ao comparar múltiplos pares. Por sua vez, nos ensaios celulares utilizou-se o teste ANOVA com o teste de comparações múltiplas de *Dunnett's*, ao comparar cada concentração com o controlo (ensaio de viabilidade celular) ou com o *t*-BOOH (ensaio de pré e co-incubação), e o teste *t* de *Welche's*, ao comparar concentrações semelhantes. O coeficiente de correlação (*r*) foi calculado pelo *Pearson Product Moment Correlation*, para determinar as correlações entre médias. Em todas as análises estatísticas, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise dos Parâmetros Físico-Químicos das Cervejas

A análise de parâmetros físico-químicos das cervejas é fundamental, uma vez que podem interferir com as propriedades organolépticas e a qualidade desta bebida. No trabalho, foram determinados parâmetros físicos e químicos, nomeadamente, o pH, a acidez total e o TAR. Outros parâmetros foram disponibilizados pelas cervejeiras ou obtidos das embalagens das cervejas (teor de álcool, cor, amargor). A tabela 6 integra os resultados dos parâmetros físico-químicos, relativos às 11 cervejas selecionadas para o estudo.

4.1.1. Teor de Álcool (*Alcohol by Volume* – ABV)

O teor de álcool é uma característica fundamental para a percepção sensorial e para os efeitos fisiológicos do consumo de cerveja. O teor de álcool, expresso em ABV, na maioria das cervejas produzidas varia entre 3,0% e 6,0% (Buiatti, 2008), o que representa 72,7% das cervejas analisadas no presente trabalho. A percentagem de ABV das cervejas artesanais variou entre 4,8% para a cerveja BP-N (Ale, estilo Brown Porter) e 9,1% para a cerveja IS-ES (Ale, estilo Imperial Stout), enquanto que nas cervejas industriais os valores obtidos foram de 5,0% para a cerveja SS-SB (Ale, estilo Sweet Stout) e 5,2% para a cerveja P-SB (Lager, estilo Pilsner). No caso das Lager, os valores de ABV variaram entre 5,0% para as cervejas L-N e P-L (estilo Lager e Pilsner, respetivamente) e 5,2% para a cerveja P-SB (estilo Pilsner).

Nos estudos de Bustos et al. (2019) e de S. Silva et al. (2022) as cervejas artesanais do estilo Imperial Stout também apresentaram teores alcoólicos elevados, 8,2% (V/V) e 11,6% (V/V), respetivamente. Além disso, também o menor valor de ABV foi observado para uma cerveja Porter (4,5%) (Bustos et al., 2019). Por sua vez, no estudo de Meza-Márquez et al. (2024) a cerveja artesanal do estilo Imperial Stout apresentou uma percentagem de ABV de 9%, sendo ultrapassada pela cerveja artesanal Barley Wine (ABV = 10,4%) (Meza-Márquez et al., 2024).

Comparando as cervejas artesanais e industriais, Bortoleto et al. (2022) sugeriram que o teor de álcool tende a ser superior nas cervejas artesanais, com valores no seu estudo a variar entre 4,5 e 5,4% (V/V) nas cervejas industriais (n = 8) e entre 4,4-9,1% (V/V) nas cervejas artesanais (n = 18), o que é concordante com os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos das cervejas em estudo (álcool, cor, amargor, pH, acidez total e teor de açúcares redutores).

Tipo	Amostra da Cerveja	Estilo da Cerveja	Álcool (% ABV)	Cor (EBC)	Amargor (IBU)	pH	Acidez Total (% de ácido láctico)	Teor de Açúcares Redutores (mg GE/L)
Ale	BA-ET	Brown Ale	5,5	21	25	4,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	5011,3 ± 68,8
	DB-ET	Dubble Belga	6,8	n.d.	24	4,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	6772,1 ± 39,0
	BP-N	Brown Porter	4,8	59	30	4,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	7276,9 ± 65,6
	IS-ES	Imperial Stout	9,1	70	68	4,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	13553,2 ± 239,0
	IS-N	Imperial Stout	8,5	124	30	4,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0	16480,0 ± 156,6
	SS-SB [#]	Sweet Stout	5,0	185	17	4,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	15767,5 ± 200,0
	PA-ET	Pale Ale	6,0	n.d.	54	4,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	5448,8 ± 93,8
	IPA-N	India Pale Ale	6,0	11	50	4,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	5836,3 ± 43,8
Lager	L-N	Lager	5,0	10	18	4,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2475,8 ± 26,0
	P-L	Pilsner	5,0	7	26	4,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	3913,3 ± 85,1
	P-SB [#]	Pilsner	5,2	8	18	4,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1567,5 ± 12,5

Os valores de pH, acidez total e teor de açúcares redutores são a média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. #: cervejas industriais; n.d.: não disponível.

ABV: *Alcohol by Volume*; EBC: *European Brewery Convention*; IBU: Unidades Internacionais de Amargor; GE: Equivalentes de Glicose.

Na análise de cervejas industriais, Boronat et al. (2020) verificaram que o teor alcoólico nas cervejas do tipo Ale (n = 18) variou entre 4,3–8,5% (V/V), enquanto nas cervejas do tipo Lager (n = 22) variou entre 3,5 e 7,5% (V/V). Também no seu estudo, Nardini e Foddai (2020) verificaram que cervejas industriais do tipo Ale (n = 3) apresentaram um teor de álcool entre 5,2 e 6,6% vol. e as cervejas industriais do estilo Lager (n = 2) um teor entre 4,6–4,8% vol.. No estudo de Breda et al. (2022) foram analisadas somente cervejas artesanais, apresentando as cervejas do tipo Ale (n=19) uma percentagem ABV de 4,5% a 8,5%, e as cervejas do tipo Lager (n = 5) de 5,0% a 6,0%. A literatura mencionada é concordante com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual as cervejas do tipo Ale apresentaram maior percentagem ABV (4,8–9,1%) face às cervejas tipo Lager (5,0–5,2%). Além disso, os resultados dos vários estudos e do presente trabalho apontam para uma diferença de valores, nos diferentes tipos/estilos de cerveja. Esta diferença no teor de álcool pode dever-se ao uso de matérias-primas e métodos de produção distintos, uma vez que este teor depende da extração de hidratos de carbono do malte e do processo de fermentação (Meza-Márquez et al., 2024).

O consumo excessivo de álcool presente nas cervejas provoca efeitos nocivos na saúde humana dada a sua toxicidade, porém quando consumido em moderação pode ter efeitos fisiológicos benéficos para o consumidor (Boronat et al., 2020; Gaetano et al., 2016; Tirado-Kulieva et al., 2023). No estudo de Chiva-Blanch et al. (2015) realizado em 33 indivíduos do sexo masculino, verificou-se que o álcool presente na cerveja levou ao aumento das concentrações plasmáticas da lipoproteína de elevada densidade (HDL), da apolipoproteína A-I (ApoA-I) e da ApoA-II, contribuindo ainda para a diminuição das concentrações séricas de fibrinogénio (fator de coagulação), o que se traduz na melhoria do perfil lipídico e diminuição do risco de aterosclerose. Além disso, o consumo de álcool em níveis baixos a moderados está associado à redução dos níveis da proteína C-reativa, à diminuição da produção de citocinas inflamatórias (interleucina-6), bem como à redução da probabilidade e da extensão da lesão de isquemia-reperfusão em indivíduos com risco de doença cardiovascular (Collins et al., 2009). Uma meta-análise, realizada por Koppes et al. (2005), revelou que em consumidores moderados de álcool (6–48 g/dia) há uma redução de aproximadamente 30% do risco de desenvolver diabetes tipo 2, enquanto que em consumidores abusivos (≥ 48 g/dia) não se observa nenhuma redução do risco. O consumo moderado de álcool apresenta efeitos positivos nos níveis de insulina e na sensibilidade à mesma em pessoas não diabéticas, indicando que este consumo pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2 (Gaetano et al., 2016). Além disso, um consumo moderado

de álcool na forma de cerveja está ainda associado a uma melhor densidade óssea femoral em comparação ao não consumo de álcool (Gaetano et al., 2016).

O consumo de álcool também pode ter efeitos neuroprotetores, uma vez que o álcool aumenta inicialmente a liberação de acetilcolina no hipocampo, o que está relacionado com a melhoria no desempenho da memória (Letenneur et al., 2004). Além disso, atua na diminuição do risco de demência através de alterações protetoras na vasculatura cerebral (Collins et al., 2009). De salientar, que o estudo de Mehlig et al. (2007) realizado em mulheres com idade entre 38 e 60 anos (n = 1462), revelou que o consumo de vinho foi associado a uma maior longevidade e uma menor incidência de demência, enquanto que o consumo de cerveja mostrou o mesmo potencial para a longevidade, mas menor potencial para a diminuição de demência. Por outro lado, as bebidas espirituosas revelaram diminuir a longevidade em indivíduos sem demência e aumentar de forma significativa o risco de demência ($p < 0,05$) (Mehlig et al., 2007).

4.1.2. Cor (*European Brewery Convention – EBC*)

Relativamente ao parâmetro de cor das cervejas este foi apresentado em unidades EBC (Tabela 6), que são as unidades utilizadas na Europa, e cujo cálculo pode ser feito espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 430 nm ($EBC = 25 \times d \times A_{430\text{ nm}}$, sendo d o fator de diluição e $A_{430\text{ nm}}$ a absorvância) (Thesseling et al., 2019). A cerveja artesanal (IS-N) do estilo Imperial Stout e a cerveja industrial (SS-SB) do estilo Sweet Stout foram as que apresentaram maior valor de EBC (124 e 185, respetivamente), sendo estas as cervejas mais escuras. Por sua vez, as cervejas com menores valores de EBC e, como tal, mais claras, foram as cervejas do estilo Pilsner, uma artesanal (P-L, EBC = 7) e a outra industrial (P-SB, EBC = 8).

No seu estudo, S. Silva et al. (2022) também discutiram o EBC das cervejas, tendo os valores de EBC variado, nas cervejas artesanais, entre 7 (estilo Pilsner) e 130 (estilo Imperial Stout), enquanto nas cervejas industriais o EBC variou entre 6 (estilo Pilsner) e 39 (estilo Munich Dunkel). Por sua vez, no estudo de Bortoleto et al. (2022) as cervejas artesanais apresentaram valores entre 7 (estilo Witbier) e 156 (estilo Quadruple), e as cervejas industriais valores de EBC entre 6 (estilo Pilsner) e 10 (estilo Premium American Lager). Por fim, no estudo de Meza-Márquez et al. (2024) a cerveja artesanal com maior valor de EBC (41,7) pertencia ao estilo Stout, enquanto que a cerveja artesanal que apresentou menor valor de EBC (2,1) pertencia ao estilo Berliner Weiss.

No que diz respeito à cor da cerveja, de acordo com Baxter e Hughes (2001) a escala EBC varia de 4,5 a 1550 e cada valor de cor confere um atributo de sabor à cerveja. Desta forma, verifica-se uma grande variação de cor nas cervejas, o que se deve à utilização de diferentes tipos de malte e de diferentes ingredientes (frutas ou especiarias) e à temperatura e tempo de torrefação dos cereais maltados e não maltados, uma vez que quanto maior for o nível de torrefação dos cereais maior será o EBC da cerveja (Breda et al., 2022; Meza-Márquez et al., 2024).

Assim sendo, a cor da cerveja é um parâmetro importante, uma vez que é associado pelo consumidor à qualidade desta bebida. A maior intensidade de cor chega a aumentar em 5% a probabilidade de uma marca de cerveja ser comprada em detrimento de outra. Além disso, a cor da cerveja pode influenciar as preferências dos consumidores, pelo que as marcas promovem o consumo de cervejas claras no verão, associando-as a uma sensação de frescura, enquanto as cervejas escuras são vistas como mais apropriadas para as estações frias (Rosales et al., 2021). As cervejas mais claras tendem a ser associadas a aromas de doces, nozes, caramelo e cereais, enquanto as cervejas mais escuras tendem a possuir aromas a chocolate, café, fumo, frutas, malte e caramelo (Bortoleto et al., 2022).

4.1.3. Amargor (Unidades Internacionais de Amargor – IBU)

O parâmetro de amargor das cervejas foi expresso em IBU, que fornece um valor aproximado de iso- α -ácidos presentes em miligramas de iso- α -ácido por litro de cerveja (Oladokun et al., 2017). Os valores variaram entre 17 para a cerveja SS-SB (Ale, estilo Sweet Stout) e 68 para a cerveja IS-ES (Ale, estilo Imperial Stout). No caso das cervejas artesanais, o menor valor de amargor observou-se para a cerveja L-N, do tipo e estilo Lager (IBU = 18) e o maior valor para a cerveja IS-ES, do tipo Ale e estilo Imperial Stout (IBU = 68). No caso das cervejas industriais, os valores de amargor foram de 17 para a cerveja SS-SB (Ale, estilo Sweet Stout) e 18 para a cerveja P-SB (Lager, estilo Pilsner) (Tabela 6).

No estudo de S. Silva et al. (2022) os valores de amargor nas cervejas artesanais variaram entre 13 (estilo Blond Ale) e 80 (estilo India Pale Ale) e nas cervejas industriais variaram entre 13 (estilo Munich Dunkel) e 30 (estilo Pilsner). No estudo de Bortoleto et al. (2022) o menor valor foi atribuído à cerveja artesanal do estilo Weizen (IBU = 6) e o maior valor atribuído à cerveja artesanal do estilo American Pale Ale (IBU = 57). Nas cervejas industriais, as cervejas do estilo Pilsner e American Lager apresentaram amargor de 8 e a cerveja estilo American Premium Lager

um valor de amargor de 20 (Bortoleto et al., 2022). No trabalho de Rosales et al. (2021) as cervejas artesanais apresentaram maiores valores de amargor e de atividade antioxidante, com um IBU médio de $21,31 \pm 1,39$ para as cervejas artesanais e um IBU médio de $16,99 \pm 0,76$ para as cervejas industriais. Bustos et al. (2019) e Meza-Márquez et al. (2024), à semelhança do presente trabalho, verificaram a que a cerveja do estilo Imperial Stout apresentou o maior valor de amargor (IBU = 34 e IBU = 72, respetivamente).

Dos estudos analisados, as cervejas artesanais aparentam ter maior amargor face às cervejas industriais (Bortoleto et al., 2022; Rosales et al., 2021; S. Silva et al., 2022). Os principais responsáveis pelo amargor da cerveja são os iso- α -ácidos, que são produtos da isomerização dos α -ácidos presentes no lúpulo, que ocorre durante a ebulição do mosto (Oladokun et al., 2016). Desta forma, as cervejas artesanais, habitualmente, apresentam maiores quantidades de lúpulo face às cervejas industriais e maior concentração de isohumulona, pelo que, conseqüentemente, possuem maior amargor (Bortoleto et al., 2022; Rodhouse & Carbonero, 2019).

No presente trabalho, observou-se que, genericamente, as cervejas do tipo Ale apresentaram maiores valores de amargor (IBU entre 17 e 68) face às cervejas do tipo Lager (IBU entre 18 e 26). Estes resultados vão de encontro aos de Boronat et al. (2020), que verificaram nas cervejas artesanais do tipo Ale um IBU entre 12 e 78 e nas cervejas tipo Lager um IBU entre 10,5 e 40. Também no estudo de Nardini e Foddai (2020) as cervejas industriais apresentaram um amargor de 25 a 35 (tipo Ale) e de 15 a 20 (tipo Lager). Esta diferença de valores de amargor nas cervejas, prende-se com a utilização de diferentes tipos de lúpulos no processo de fabrico da cerveja e com o tempo de fervura do mesmo, pelo que a utilização de lúpulos com maior quantidade de α -ácidos e maior tempo de fervura traduz-se numa cerveja com maiores valores de IBU (Rodhouse & Carbonero, 2019).

De salientar, que no presente trabalho o maior valor de EBC e de amargor encontra-se em cervejas do estilo Stout, porém em cervejas de marcas distintas (SS-SB e IS-ES). Estes dois parâmetros não possuem linearidade, uma vez que se verifica a existência de cervejas claras com teor de amargor elevado, como é o caso da cerveja IPA-N, estilo India Pale Ale (IBU = 50) e cervejas escuras com teor de amargor inferior, nomeadamente, a cerveja IS-N, estilo Imperial Stout (IBU = 30). Os consumidores têm, frequentemente, a expectativa que as cervejas mais escuras possuem maior amargor, porém no estudo de Reinoso-Carvalho et al. (2019) verificou-se que o parâmetro de amargor nas cervejas escuras foi menos pronunciado do que o esperado, o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente trabalho.

4.1.4. pH

A determinação do pH é crucial, uma vez que influencia a produção da cerveja desde as reações enzimáticas até aos processos microbiológicos (Meza-Márquez et al., 2024). No presente trabalho, o pH das cervejas analisadas variou entre 4,0 e 4,6 (Tabela 6).

As cervejas artesanais dos estilos Brown Porter (BP-N) e Pilsner (P-L) apresentaram o menor valor de pH ($4,0 \pm 0,0$), enquanto que as cervejas artesanais do estilo Dubble Belga (DB-ET) e Imperial Stout (IS-N) apresentaram o maior valor ($4,6 \pm 0,0$). As cervejas industriais SS-PB (estilo Sweet Stout) e P-SB (estilo Pilsner) apresentam o mesmo valor de pH, ou seja, $4,1 \pm 0,0$. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura (Bustos et al., 2019; Nardini & Foddai, 2020; Rosales et al., 2021; S. Silva et al., 2022). No seu trabalho, S. Silva et al. (2022) observaram para as cervejas artesanais analisadas ($n = 16$) um valor pH entre $4,27 \pm 0,003$ (estilo Vienna Lager), e $4,92 \pm 0,02$ (estilo India Pale Ale), enquanto o pH das cervejas industriais ($n = 3$) variou entre $4,45 \pm 0,06$ (estilo Pilsner) e $4,56 \pm 0,05$ (estilo Munich Dunkel). No estudo de Bustos et al. (2019) o pH variou entre $4,00 \pm 0,05$ (estilo Imperial Stout) e $4,43 \pm 0,04$ (estilo Porter). Rosales et al. (2021) verificaram que o valor médio do pH das cervejas artesanais é de $3,92 \pm 0,07$ e das cervejas industriais é de $3,82 \pm 0,07$. Por fim, Nardini e Foddai (2020) mencionaram que cervejas industriais do tipo Ale possuíam um pH entre 4,29–4,61 e as cervejas do tipo Lager um pH de 4,43 e 4,87.

4.1.5. Acidez Total

A acidez total das cervejas artesanais analisadas variou entre $0,1 \pm 0,0\%$ de ácido láctico para a cerveja BP-N (estilo Brown Porter) e $0,3 \pm 0,0\%$ de ácido láctico para a cerveja IS-N e IS-ES (estilo Imperial Stout); a acidez total das cervejas industriais foi de $0,2 \pm 0,0\%$ de ácido láctico para a cerveja P-SB (estilo Pilsner) e $0,3 \pm 0,0\%$ de ácido láctico para a cerveja SS-SB (estilo Sweet Stout) (Tabela 6).

Os resultados assemelham-se aos encontrados na literatura (Bustos et al., 2019; Pai et al., 2015; S. Silva et al., 2022). No estudo de S. Silva et al. (2022) a acidez total nas cervejas artesanais variou entre $0,15 \pm 0,00\%$ (estilo Pilsner) e $0,62 \pm 0,01\%$ (estilo Imperial Stout) e nas cervejas industriais variou entre $0,10 \pm 0,00\%$ (estilo Munich Dunkel) e $0,15 \pm 0,00\%$ (estilo Pilsner). Por sua vez, Bustos et al. (2019) observaram que a acidez total das cervejas artesanais variou entre

0,0851 ± 0,0057% (estilo London Porter) e 0,2106 ± 0,0229% (estilo Imperial Stout). Por fim, as cervejas do estilo Pale Lager estudadas por Pai et al. (2015) obtiveram um valor de acidez entre 0,1088 ± 0,0038% e 0,2252 ± 0,0000%. A determinação da acidez e do pH é importante, uma vez que influencia as características organolépticas, a estabilidade biológica e química da cerveja (Pai et al., 2015).

4.1.6. Teor de Açúcares Redutores (TAR)

O TAR das cervejas analisadas variou entre 1567,5 ± 12,5 mg GE/L para a cerveja industrial P-SB (Lager, estilo Pilsner) e 16480,0 ± 156,6 mg GE/L para a cerveja artesanal IS-N (Ale, estilo Imperial Stout). Entre as cervejas Ale e Lager, as Ale apresentaram os valores mais elevados; dentro das Ale, as Stout foram as que obtiveram maiores TAR (Tabela 6). Realça-se que a cerveja industrial SS-SB (Lager, estilo Sweet Stout) apresentou o segundo maior valor de TAR (15767,5 ± 200,0 mg GE/L), sendo este resultado esperado, uma vez que a lista de ingredientes presente na embalagem indica a adição de açúcar.

Comparando com outros estudos, também no estudo de S. Silva et al. (2022), as cervejas industriais apresentaram TAR, no geral, mais reduzidos (2598,0 ± 0,0 mg GE/L). Além disso, no mesmo estudo, a cerveja artesanal de estilo Imperial Stout revelou o maior TAR (4446,3 ± 31,1 mg GE/L) (S. Silva et al., 2022). Porém, é de realçar a diferença de valores encontrados na literatura, em que no estudo de S. Silva et al. (2022) o TAR nas cervejas variou apenas entre 2239,7 ± 62,6 mg GE/L para a cerveja artesanal do estilo Blond Ale e 4446,3 ± 31,1 mg GE/L para uma cerveja artesanal do estilo Imperial Stout. Por sua vez, no estudo de Chen et al. (2022) a cerveja analisada apresentou um TAR de 10470,0 ± 3,63 mg GE/L.

A diferença de valores no que diz respeito ao TAR, pode dever-se às diferentes marcas, tipos e estilos de cervejas, às matérias-primas que as constituem, bem como à utilização de diferentes processos de produção (Meza-Márquez et al., 2024).

A determinação do TAR oferece informação importante para a otimização e regulação do processo de fermentação, permitindo o aumento do rendimento e da qualidade do produto final (Zhang et al., 2019). Além disso, as leveduras só podem metabolizar açúcares de baixo peso molecular, nomeadamente, a frutose, maltose, sacarose, glicose e maltotriose, pelo que se a fermentação for interrompida antes de estar concluída a cerveja irá possuir maior TAR (Pai et al., 2015).

4.2. Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TPC)

A cerveja é uma das principais fontes de compostos fenólicos, derivados principalmente do malte (75–80%) e do lúpulo (15–25%) (S. Silva et al., 2022; Zhao et al., 2013). Os compostos fenólicos são metabolitos secundários contendo pelo menos um anel aromático ligado a grupos hidroxilo ou outros elementos estruturais. Estes compostos constituem um grupo diversificado de substâncias, com diferentes estruturas químicas, diferindo em termos de resistência aos radicais livres e à quelação de metais, bem como a outras reações que ocorrem na cerveja ou em células vivas (Quesada-Molina et al., 2019).

Na cerveja, os compostos fenólicos (polifenóis) têm sido associados à formação de turvação, pela ligação às proteínas. A turvação, resultante do complexo proteína-polifenóis constitui uma característica visual não apelativa para a maioria dos consumidores de cerveja (Aron & Shellhammer, 2010; Marques et al., 2017). No entanto, os compostos fenólicos também estão associados à estabilidade do sabor, face às suas propriedades antioxidantes. Estes compostos, conhecidos como bons agentes antioxidantes, podem inibir reações de deterioração oxidativa, resultando em cervejas com uma estabilidade mais prolongada do sabor (Jaskula-Goiris et al., 2014; Zhao et al., 2010). Desta forma, os compostos fenólicos desempenham papéis críticos nas propriedades sensoriais, na cor e na estabilidade coloidal da cerveja, além de contribuírem para a atividade antioxidante (Marques et al., 2017; Zhao et al., 2010). Os compostos fenólicos desempenham ainda um papel crucial no fornecimento de antioxidantes à dieta e ajudam a manter o equilíbrio redox endógeno, em humanos (Mitić et al., 2014).

O TPC é geralmente expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), podendo ser determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Este método colorimétrico baseia-se na reação de transferência de elétrons entre os compostos fenólicos e o reagente *Folin Ciocalteu*, o que resulta numa mudança de cor de amarelo para azul, proporcional à quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, à capacidade redutora dos antioxidantes da amostra (Lamuela-Raventós, 2017; Pires et al., 2017).

Na tabela 7 estão presentes os resultados do ensaio TPC realizado nas 11 cervejas artesanais e industriais. Os valores de TPC variaram entre $4,1 \pm 0,4$ mg GAE/g para a cerveja artesanal PA-ET (estilo Pale Ale) e $9,5 \pm 0,3$ mg GAE/g para a cerveja artesanal BP-N (estilo Brown Porter).

Tabela 7. Resultados da determinação do teor de fenólicos totais (TPC) nas cervejas.

Tipo	Amostra da Cerveja	Estilo da Cerveja	TPC (mg GAE/g)
Ale	BA-ET	Brown Ale	5,5 ± 0,1 ^{c,e,f}
	DB-ET	Dubble Belga	6,0 ± 0,1 ^{c,e,f,g}
	BP-N	Brown Porter	9,5 ± 0,3 ^{a,b,d,f,g,h,i,j,k}
	IS-ES	Imperial Stout	6,8 ± 0,6 ^{c,e,g,k}
	IS-N	Imperial Stout	8,3 ± 0,2 ^{a,b,d,g,h,i,j,k}
	SS-SB [#]	Sweet Stout	7,6 ± 0,1 ^{a,b,c,g,i,j,k}
	PA-ET	Pale Ale	4,1 ± 0,4 ^{b,c,d,e,f,h,i}
Lager	IPA-N	India Pale Ale	6,6 ± 0,2 ^{c,e,g,k}
	L-N	Lager	6,4 ± 0,2 ^{c,e,f,g}
	P-L	Pilsner	5,5 ± 0,1 ^{c,e,f}
	P-SB [#]	Pilsner	5,0 ± 0,1 ^{c,d,e,f,h}

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. #: cervejas industriais; GAE: Equivalentes de Ácido Gálico; ^a Significativamente diferente quando comparado com BA-ET ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com DB-ET ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com BP-N ($p < 0,05$); ^d Significativamente diferente quando comparado com IS-ES ($p < 0,05$); ^e Significativamente diferente quando comparado com IS-N ($p < 0,05$); ^f Significativamente diferente quando comparado com SS-SB ($p < 0,05$); ^g Significativamente diferente quando comparado com PA-ET ($p < 0,05$); ^h Significativamente diferente quando comparado com IPA-N ($p < 0,05$); ⁱ Significativamente diferente quando comparado com L-N ($p < 0,05$); ^j Significativamente diferente quando comparado com P-L ($p < 0,05$); ^k Significativamente diferente quando comparado com P-SB ($p < 0,05$).

As cervejas mais escuras (estilo Imperial Stout, Sweet Stout e Brown Porter) apresentaram maior TPC, o que é concordante com a literatura (Horn et al., 2021; Marques et al., 2017 e S. Silva et al., 2022). Sabe-se que o perfil de polifenóis totais e ácidos fenólicos varia entre os diferentes tipos/estilos de cerveja, com os valores mais elevados a serem observados em cervejas pretas, abbey e bock, assim como em cervejas frutadas (Habschied, Lončarić, et al., 2020; Piazzon et al., 2010). No estudo de Horn et al. (2021) o TPC mais elevado foi de $3,70 \pm 0,08$ mg GAE/mL, para uma cerveja artesanal, estilo Imperial Stout. Por sua vez, Marques et al. (2017) e S. Silva et al. (2022) obtiveram valores do TPC nas cervejas artesanais que variaram entre $448,57 \pm 0,37$ mg GAE/L (estilo Classic American Pilsner) e $531,30 \pm 0,29$ (estilo Brown Porter) e entre $343,8 \pm 22,2$

mg GAE/L (estilo Pilsner) e $2172,5 \pm 170,1$ mg GAE/L (estilo Imperial Stout), respetivamente. Granato et al. (2011) também compararam cervejas escuras com cervejas claras e obtiveram valores mais elevados para cervejas escuras (280–525 vs. 119–200 mg GAE/L). As cervejas escuras podem apresentar maior TPC devido à maior presença de cevada maltada e ao teor de polifenóis gerado durante o processo de maltagem (Granato et al., 2011).

Nas cervejas industriais o maior TPC também foi atribuído a uma cerveja escura, tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa entre a Sweet Stout ($7,6 \pm 0,1$ mg GAE/g) e a cerveja Pilsner ($5,0 \pm 0,1$ mg GAE/g) ($p < 0,05$). No estudo de Granato et al. (2011) e de S. Silva et al. (2022) as cervejas industriais apresentaram valores de TPC que variaram de 119,96 mg GAE/L (tipo Lager) a 525,93 mg GAE/L (estilo Brown Ale), e de $255,3 \pm 69,6$ mg GAE/L (estilo Pilsner) a $394,0 \pm 48,7$ mg GAE/L (estilo Munich Dunkel), respetivamente. No entanto, no estudo de Gouvinhas et al. (2021) o maior TPC esteve presente na cerveja industrial do tipo Ale, $0,824 \pm 0,074$ g de GA/L, pelo que os resultados são concordantes com o presente estudo, uma vez que a cerveja industrial SS-SB (Ale, estilo Sweet Stout) foi a que apresentou maior TPC.

Nas cervejas artesanais do tipo Ale os valores do TPC variaram de $4,1 \pm 0,4$ mg GAE/g (IPA-N, estilo India Pale Ale) a $9,5 \pm 0,3$ mg GAE/g (BP-N, estilo Brown Porter), e nas cervejas artesanais do tipo Lager o TPC foi de $5,5 \pm 0,1$ mg GAE/g (P-L, estilo Pilsner) e $6,4 \pm 0,2$ mg GAE/g (L-N, estilo Lager) (Tabela 7). Os resultados não vão de encontro aos do estudo de Breda et al. (2022) onde a cerveja artesanal do tipo Ale clara apresentou um TPC significativamente superior às demais cervejas Ale e Lager analisadas ($1,614 \pm 0,280$ g GA/L) ($p < 0,05$). Breda et al. (2022) também apuraram que o maior TPC esteve presente numa cerveja clara, o que não vai de encontro aos resultados obtidos neste trabalho. No entanto, sabe-se que, no geral, as cervejas tipo Ale apresentam maiores TPC que as Lager (Neto et al., 2017), tal como se observou no presente trabalho. Num estudo comparativo com diferentes cervejas brasileiras, observou-se que as cervejas estilo Brown Ale apresentaram um TPC mais elevado, assim como maiores propriedades antioxidantes (Granato et al., 2011)

No que concerne à comparação entre as cervejas artesanais de Portugal e Espanha, observa-se que as cervejas artesanais portuguesas BP-N (estilo Brown Porter) e IS-N (estilo Imperial Stout) apresentam um valor de TPC significativamente superior ($p < 0,05$) a todas as cervejas artesanais espanholas analisadas (BA-ET, estilo Brown Ale; DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-ES, Imperial Stout; PA-ET, estilo Pale Ale). Destaca-se ainda que, apesar de tanto a cerveja IS-N (estilo Imperial Stout) quanto a IS-ES (estilo Imperial Stout) pertencerem ao mesmo estilo, elas

apresentam valores de TPC significativamente diferentes ($p < 0,05$) ($8,3 \pm 0,2$ mg GAE/g e $6,8 \pm 0,6$ mg GAE/g, respetivamente) sendo a cerveja portuguesa (IS-N) a que apresenta o valor mais elevado.

Sabe-se que o estilo de cerveja pode afetar as concentrações relativas dos compostos fenólicos. No entanto, não está claro se as diferenças no conteúdo fenólico entre cervejas podem dever-se às diferenças nas matérias-primas ou à tecnologia de fabrico da cerveja (D. Yang & Gao, 2021). De acordo com Elrod et al. (2019), quanto menor o teor de α -ácido de uma variedade de lúpulo, maior é a concentração fenólica e a atividade antioxidante. Por sua vez, Pascoe et al. (2003) determinaram os pontos críticos do processo de fabrico de cerveja para alterações na atividade antioxidante e nos níveis de compostos fenólicos na cerveja Ale. Assim, a diminuição nos níveis de atividade antioxidante foi observada após moagem e filtração da cerveja, enquanto aumentos foram observados após a ebulição e fermentação (Pascoe et al., 2003). Aumentos adicionais ocorreram após a separação do mosto e carbonatação e engarrafamento (Pascoe et al., 2003). Desta forma, os mesmos estilos de cerveja podem variar na composição de compostos bioativos, dependendo do tipo de lúpulo usado e do processo de fabrico da cerveja (Elrod et al., 2019).

O TPC das cervejas artesanais tende a ser superior ao das cervejas industriais, o que pode ser justificado pelas cervejeiras industriais utilizarem, frequentemente, métodos alternativos ou mais económicos para tornar o produto mais rentável, utilizando matérias-primas mais baratas. Em contraste, as cervejeiras artesanais geralmente utilizam apenas ingredientes como cevada e lúpulo, e ocasionalmente trigo, na produção de cerveja, o que pode ajudar a explicar a presença de uma maior abundância e diversidade de compostos fenólicos nas cervejas artesanais (Humia et al., 2019). Além disso e tal como referido anteriormente, durante o armazenamento, os compostos fenólicos da cerveja causam turvação reagindo com proteínas. Desta forma, o processo de fabrico da cerveja também tem influência no teor de compostos fenólicos, uma vez que as grandes cervejeiras geralmente utilizam o processo de filtração e clarificação, removendo esses compostos fenólicos (Marques et al., 2017). Após a filtração, a cerveja tem de ser estabilizada por antioxidantes exógenos para realçar o sabor (Marques et al., 2017). Por sua vez, a cerveja artesanal não é filtrada e não usa aditivos, apresentando teores mais altos de compostos fenólicos do que a cerveja industrial (Mastanjević et al., 2019; Zhao et al., 2013).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas e podem ser divididos em grupos, como os derivados do ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzóico

(ácidos fenólicos), os flavanóis, os ésteres e glicósidos do flavanol, ou os flavonoides prenilados (Habschied, Lončarić, et al., 2020). Em particular, os flavanóis têm grande interesse para as cervejeiras, devido aos complexos proteína-polifenóis que formam, levando à formação de turvação na cerveja (Habschied, Lončarić, et al., 2020; Steiner et al., 2010). O perfil fenólico complexo da cerveja inclui catequinas e proantocianidinas, prenilchalconas, e derivados de flavanonas, flavonóis, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e estilbenos (Collin et al., 2013). Mais especificamente, no estudo de Zhao et al. (2010), a análise quanto às concentrações relativas de compostos fenólicos em diferentes cervejas industriais do tipo Lager mostrou que a epicatequina, ácido gálico, ácido protocatucúico, (+)-catequina, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido siríngico são os compostos fenólicos mais comuns em amostras de cerveja. O ácido gálico e o ácido ferúlico são responsáveis por mais de 50% do TPC na cerveja e são os compostos fenólicos mais relatados nestas amostras (Liu et al., 2015; Montanari et al., 1999; Zhao et al., 2010).

Salienta-se que o método *Folin-Ciocalteu*, apesar de ser amplamente utilizado para bebidas e extratos vegetais, não é específico para compostos fenólicos e pode ser afetado por outros compostos com atividade redutora (Habschied, Lončarić, et al., 2020; Zhao et al., 2010). Desta forma, não se pode descuidar a possibilidade de sobrestimação dos resultados do TPC (Habschied, Lončarić, et al., 2020; Zhao et al., 2010). Para identificar o conteúdo fenólico de uma matriz, podem ser utilizadas técnicas mais seletivas, como o HPLC e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (Paiva et al., 2021). Além disso, a identificação detalhada do perfil dos fenólicos presentes nas amostras é de grande importância para sustentar as alegações de saúde associadas a uma cerveja funcional, uma vez que os benefícios à saúde dos compostos fenólicos são estudados de forma individual em pesquisas *in vivo* (Paiva et al., 2021).

Em suma, a quantidade de compostos fenólicos/antioxidantes pode variar bastante dependendo do tipo e estilo de cerveja, porém a ingestão desta bebida pode representar uma fonte de antioxidantes, particularmente na forma de compostos fenólicos (Piazzon et al., 2010).

4.3. Determinação da Capacidade Antioxidante das Cervejas

A cerveja é uma matriz heterogênea que possui antioxidantes com diferentes mecanismos de ação, o que se traduz em contribuições distintas para a sua capacidade antioxidante (Saura-Calixto et al., 2009; Zhao, 2014). Vários fatores estão envolvidos na atividade antioxidante de diferentes grupos de compostos, como a sua estrutura química, a natureza do solvente, a temperatura e o pH, assim como a estrutura química dos radicais livres. Assim, para estudar as propriedades antioxidantes, pelo menos três tipos de ensaios (com diferentes mecanismos de reação) devem ser utilizados (Martinez-Gomez et al., 2020). Desta forma, a atividade antioxidante das cervejas artesanais e industriais em estudo foi determinada recorrendo a quatro ensaios antioxidantes, o ensaio ABTS, H₂O₂, FRAP e da ferrozina, dado não existir um método padrão capaz de caracterizar objetivamente a capacidade antioxidante total da cerveja (Koren et al., 2017). Alguns dos ensaios, como o ABTS e FRAP, são comuns em cervejas devido à sua sensibilidade, conveniência e tempos curtos dos ensaios (Martinez-Gomez et al., 2020). Os resultados dos ensaios encontram-se na tabela 8.

4.3.1. Ensaio de Neutralização do Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

O ensaio ABTS é um método colorimétrico baseado na transferência de um eletrão ou doação de um hidrogénio de forma a reduzir o radical livre ABTS^{•+}. Cervejas com elevada capacidade de neutralizar o ABTS^{•+} podem estabilizar radicais ativos de oxigénio, melhorando a estabilidade do sabor. A neutralização do radical resulta na mudança de coloração de azul-esverdeado para incolor, proporcional à capacidade dos antioxidantes da amostra em neutralizá-lo (Re et al., 1999; Zhao, 2014). O IC₅₀ representa a concentração de amostra que contém antioxidantes suficientes para neutralizar 50% da quantidade inicial de radicais livres de ABTS.

No presente trabalho, nenhuma das cervejas analisadas apresentou alta capacidade antioxidante (IC₅₀ < 50 µg/mL) pelo ensaio ABTS (Kuethe & Efferth, 2010). A cerveja artesanal L-N (estilo Lager) apresentou o menor valor de IC₅₀ (68,3 ± 2,8 µg/mL), sendo significativamente inferior às cervejas analisadas (*p* < 0,05), à exceção da cerveja industrial SS-SB (estilo Sweet Stout) que apresentou um valor de IC₅₀ de 76,1 ± 1,2 µg/mL (Tabela 8), correspondendo a uma capacidade antioxidante moderada das cervejas (50 < IC₅₀ < 100 µg/mL) (Kuethe & Efferth, 2010).

Tabela 8. Resultados da capacidade antioxidante das cervejas analisadas, pelos ensaios ABTS, H₂O₂, FRAP e ferrozina.

Tipo	Amostra	Estilo	ABTS (IC ₅₀)*	H ₂ O ₂ (IC ₅₀ **	FRAP (µmol TE/g)	Ferrozina (IC ₅₀ ***
Ale	BA-ET	Brown Ale	93,7 ± 1,4 ^{b,d,e,f,h,i,j}	36,0 ± 0,3 ^{b,c,e,f,g,j,k}	34,5 ± 0,0 ^{b,c,d,e,g,h,i,j,k}	Sem IC ₅₀
	DB-ET	Dubble Belga	123,6 ± 4,7 ^{a,c,e,f,g,h,i,k}	47,5 ± 0,3 ^{a,c,d,e,f,g,h,i,j}	29,3 ± 0,0 ^{a,c,d,e,f,g,h,i,j,k}	
	BP-N	Brown Porter	89,2 ± 1,8 ^{b,d,e,f,g,h,i,j}	31,9 ± 1,0 ^{a,b,d,e,f,g,h,i,j,k}	47,2 ± 0,0 ^{a,b,d,e,f,g,h,i,j,k}	
	IS-ES	Imperial Stout	115,6 ± 7,2 ^{a,c,e,f,g,h,i,k}	35,0 ± 0,6 ^{b,c,d,e,f,g,j,k}	43,6 ± 0,0 ^{a,b,c,f,g,h,i,k}	
	IS-N	Imperial Stout	80,1 ± 1,1 ^{a,b,c,d,g,h,i,j}	27,0 ± 1,5 ^{a,b,c,d,f,g,h,i,k}	44,4 ± 0,0 ^{a,b,c,f,g,h,i,k}	
	SS-SB [#]	Sweet Stout	76,1 ± 1,2 ^{a,b,c,d,g,h,i,j,k}	20,2 ± 1,1 ^{a,b,c,d,e,g,h,i,j,k}	32,7 ± 0,0 ^{b,c,d,e,g,h,i,j,k}	
	PA-ET	Pale Ale	99,1 ± 0,7 ^{b,c,d,e,f,i,j,k}	43,4 ± 1,9 ^{a,b,c,d,e,f,h,i,j,k}	58,6 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e,f,h,i,j,k}	
	IPA-N	India Pale Ale	106,0 ± 1,2 ^{a,b,c,d,f,i,j,k}	37,5 ± 0,1 ^{b,c,e,f,g,j,k}	32,5 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e,f,g,i,j,k}	
Lager	L-N	Lager	68,3 ± 2,8 ^{a,b,c,d,e,g,h,i,j,k}	37,2 ± 1,5 ^{b,c,e,f,g,j,k}	33,4 ± 0,0 ^{b,c,d,e,g,h,i,j,k}	Sem IC ₅₀
	P-L	Pilsner	117,9 ± 0,8 ^{a,c,e,f,g,h,i,k}	27,5 ± 0,3 ^{a,b,c,d,f,g,h,i,j,k}	43,6 ± 0,0 ^{a,b,c,f,g,h,i,k}	
	P-SB [#]	Pilsner	86,0 ± 6,4 ^{b,d,f,g,h,i,j}	46,7 ± 0,4 ^{a,c,d,e,f,g,h,i,j}	20,3 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j}	

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. #: cervejas industriais; *, ** e ***: Concentração expressa em µg/mL necessária para redução de 50% do radical ABTS, das moléculas de H₂O₂, e dos íons de Fe²⁺, respetivamente; TE: Equivalentes de Trolox; ^a Significativamente diferente quando comparado com BA-ET ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com DB-ET ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com BP-N ($p < 0,05$); ^d Significativamente diferente quando comparado com IS-ES ($p < 0,05$); ^e Significativamente diferente quando comparado com IS-N ($p < 0,05$); ^f Significativamente diferente quando comparado com SS-SB ($p < 0,05$); ^g Significativamente diferente quando comparado com PA-ET ($p < 0,05$); ^h Significativamente diferente quando comparado com IPA-N ($p < 0,05$); ⁱ Significativamente diferente quando comparado com L-N ($p < 0,05$); ^j Significativamente diferente quando comparado com P-L ($p < 0,05$); ^k Significativamente diferente quando comparado com P-SB ($p < 0,05$).

Por sua vez, a cerveja que apresentou a menor capacidade antioxidante foi a artesanal DB-ET (estilo Dubble Belga) com um valor de IC_{50} de $123,6 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, apresentando, desta forma, uma baixa capacidade antioxidante com este ensaio ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Kuetze & Efferth, 2010).

Relativamente às cervejas industriais, a SS-SB (Ale, estilo Sweet Stout) revelou uma capacidade antioxidante significativamente superior à P-SB (Lager, estilo Pilsner) ($p < 0,05$) ($IC_{50} = 76,1 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ e $86,0 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$, respetivamente) (Tabela 8), apresentando ambas uma moderada capacidade antioxidante ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) (Kuetze & Efferth, 2010). O estudo de Gouvinhas et al. (2021), realizado com cervejas industriais não liofilizadas, não apresentou resultados concordantes com os obtidos no presente trabalho, uma vez que o melhor valor detetado no ensaio ABTS foi atribuído a uma cerveja do tipo Lager.

Nas cervejas artesanais do tipo Ale o IC_{50} variou entre $80,1 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja IS-N (estilo Imperial Stout) e $123,6 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja DB-ET (estilo Dubble Belga), enquanto nas cervejas artesanais do tipo Lager o valor de IC_{50} foi de $68,3 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja L-N (estilo Lager) e $117,9 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ para a cerveja P-L (estilo Pilsner) (Tabela 8). Os valores obtidos no ensaio de ABTS realizado por Breda et al. (2022) diferem dos mencionados, dado que o melhor valor foi atribuído à cerveja artesanal não liofilizada do tipo Ale clara, enquanto no presente trabalho o melhor valor foi atribuído a uma cerveja do tipo Lager (L-N, estilo Lager) e o segundo melhor valor a uma cerveja do tipo Ale escura (IS-N, estilo Imperial Stout). No estudo de Zhao et al. (2010) e de Zhao et al. (2013), realizado em cervejas industriais do tipo Lager não liofilizadas, os valores do ensaio ABTS são semelhantes entre si, variando de $0,55 \pm 0,04 \text{ mmol TE/L}$ a $1,95 \pm 0,05 \text{ mmol TE/L}$, e de $0,16 \pm 0,09 \text{ mmol TE/L}$ a $2,23 \pm 0,04 \text{ mmol TE/L}$, respetivamente.

No presente trabalho as cervejas artesanais portuguesas IS-N (estilo Imperial Stout) e L-N (estilo Lager) demonstraram uma capacidade antioxidante significativamente superior em comparação com as cervejas artesanais espanholas analisadas (BA-ET, estilo Brown Ale; DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-ES, Imperial Stout; PA-ET, estilo Pale Ale) ($p < 0,05$). A cerveja artesanal portuguesa BP-N (estilo Brown Porter) também se destacou, apresentando uma capacidade antioxidante significativamente superior ao das cervejas espanholas DB-ET (estilo Dubble Belga), IS-ES (estilo Imperial Stout) e PA-ET (estilo Pale Ale) ($p < 0,05$). No caso da cerveja portuguesa IPA-N (estilo India Pale Ale), verificou-se uma atividade antioxidante significativamente superior às cervejas DB-ET (estilo Dubble Belga) e IS-ES (estilo Imperial Stout) ($p < 0,05$), embora essa capacidade tenha sido inferior à observada na cerveja espanhola BA-ET (estilo Brown Ale). Por outro lado, a cerveja portuguesa P-L (estilo Pilsner) apresentou

atividade antioxidante significativamente inferior às cervejas espanholas BA-ET (estilo Brown Ale) e PA-ET (estilo Pale Ale) ($p < 0,05$), sem, contudo, haver diferença significativa em relação às demais cervejas espanholas (DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-ES, estilo Imperial Stout).

Salienta-se que os valores do ensaio ABTS do estudo de Breda et al. (2022), com cervejas artesanais ($1142 \pm 0,025$ a $10913 \pm 0,305$ mmol Trolox/L), são superiores aos obtidos nos estudos de Zhao et al. (2010) e de Zhao et al. (2013) realizados em cervejas industriais, o que corrobora os resultados deste trabalho, uma vez que a melhor capacidade antioxidante está presente numa cerveja artesanal (L-N, estilo Lager). Tal pode ser justificado pela utilização de diferentes matérias primas e pelo processo de fabrico da cerveja, que são parâmetros que podem ter efeitos consideráveis na atividade de inibição dos radicais livres de ABTS (Zhao et al., 2010).

4.3.2. Ensaio do Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2)

O ensaio do H_2O_2 baseia-se na capacidade dos antioxidantes da amostra neutralizarem as moléculas de H_2O_2 , prevenindo a formação de radicais livres $\cdot OH$ que iniciam a cadeia oxidativa (Nur Alam et al., 2012). Desta forma, o IC_{50} representa a concentração de amostra que contém antioxidantes suficientes para neutralizarem 50% da quantidade inicial de moléculas de H_2O_2 (Tabela 8).

No ensaio do H_2O_2 , todas as cervejas analisadas apresentaram alta capacidade antioxidante ($IC_{50} < 50$ $\mu g/mL$), destacando-se a cerveja industrial SS-SB (estilo Sweet Stout) com uma capacidade antioxidante significativamente superior às restantes cervejas ($IC_{50} = 20,2 \pm 1,1$ $\mu g/mL$) ($p < 0,05$). Contudo, não existe linearidade no que concerne à melhor capacidade antioxidante pertencer às cervejas industriais, uma vez que a P-SB (estilo Pilsner) apresenta a segunda pior capacidade antioxidante ($IC_{50} = 46,7 \pm 0,4$ $\mu g/mL$). Ainda com alta atividade antioxidante, seguiram-se as cervejas artesanais IS-N (estilo Imperial Stout) com um valor de IC_{50} de $27,0 \pm 1,5$ $\mu g/mL$, e a P-L (estilo Pilsner) com um valor de IC_{50} de $27,5 \pm 0,3$ $\mu g/mL$ (Tabela 8).

As cervejas artesanais portuguesas BP-N (estilo Brown Porter), IS-N (estilo Imperial Stout) e P-L (estilo Pilsner) demonstraram uma capacidade significativamente superior ($p < 0,05$) de neutralizar as moléculas de H_2O_2 em comparação com todas as cervejas artesanais espanholas analisadas (BA-ET, estilo Brown Ale; DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-ES, Imperial Stout; PA-ET, estilo Pale Ale).

Até ao momento, a literatura é escassa sobre a realização do ensaio de neutralização de H_2O_2 para determinar a capacidade antioxidante de cerveja. No único estudo analisado, de Okechukwu et al. (2022), realizado numa cerveja industrial do estilo German Pilsner, a capacidade de neutralização de H_2O_2 foi de $88,86 \pm 0,13\%$. No entanto, o ensaio é importante, pois permite determinar a eliminação de um radical fisiologicamente relevante, existindo a hipótese de que a geração de H_2O_2 poder ser considerada como um fator intermediário chave no processo de oxidação da cerveja, podendo o H_2O_2 ser depois convertido em outros radicais livres (Martini et al., 2017; Uchida & Ono, 1999).

4.3.3. Ensaio do Poder Antioxidante da Redução do Ferro (FRAP)

O ensaio do FRAP é um método colorimétrico que se baseia na capacidade dos antioxidantes da amostra reduzirem o ião Fe^{3+} (ião férrico), presente no complexo TPTZ, a Fe^{2+} pela transferência de eletrões. Quando esta redução ocorre, a cor da solução muda de roxo-claro para roxo-intenso (Urrea-Victoria et al., 2016) (Tabela 8).

No ensaio do FRAP a cerveja artesanal PA-ET (estilo Pale Ale) apresentou o maior valor de redução do ião Fe^{3+} ($58,6 \pm 0,0 \mu\text{mol TE/g}$), sendo este significativamente superior às restantes cervejas ($p < 0,05$). Por sua vez, a cerveja industrial P-SB (estilo Pilsner) foi a que teve menor valor de FRAP ($20,3 \pm 0,0 \mu\text{mol TE/g}$).

No estudo de Censi et al. (2021) os valores do ensaio do FRAP variaram entre $104,046 \pm 7,680 \mu\text{mol TE/g}$ (estilo Triple malt) e $125,159 \pm 1,237 \mu\text{mol TE/g}$ (estilo Black), sendo estes superiores aos obtidos no presente trabalho. Estes resultados também indicam que a utilização de diferentes matérias-primas, diferentes processos de fabrico, bem como a utilização de amostras distintas podem influenciar o poder antioxidante de reduzir o ião Fe^{3+} (Mitić et al., 2014). Por sua vez, Mitić et al. (2014) apuraram que as cervejas industriais escuras apresentaram maior capacidade antioxidante do que as cervejas claras ($629,82\text{--}831,20 \text{ mmol } Fe^{2+}/L$ e $22,99\text{--}762,57 \text{ mmol } Fe^{2+}/L$, respetivamente). Em contrapartida, no presente trabalho o maior valor do FRAP, tal como já mencionado, foi atribuído a uma cerveja artesanal clara (PA-ET, estilo Pale Ale). Porém, as cervejas artesanais escuras apresentaram o segundo e terceiro melhores valores, $47,2 \pm 0,0$ (BP-N, estilo Brown Porter) e $44,4 \pm 0,0$ (IS-N, estilo Imperial Stout), respetivamente.

As cervejas artesanais portuguesas apresentaram uma capacidade antioxidante inferior à da cerveja artesanal espanhola PA-ET (estilo Pale Ale). No entanto, a cerveja artesanal portuguesa

BP-N (estilo Brown Porter) destaca-se por possuir uma capacidade antioxidante significativamente superior às demais cervejas artesanais espanholas (BA-ET, estilo Brown Ale; DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-ES, Imperial Stout) ($p < 0,05$). As cervejas IS-N (estilo Imperial Stout) e P-L (estilo Pilsner), mostraram-se significativamente superiores às cervejas espanholas BA-ET (estilo Brown Ale) e DB-ET (estilo Dubble Belga) ($p < 0,05$).

4.3.4. Atividade Quelante de Metais (MCA)

O ensaio da ferrozina é um método colorimétrico baseado na capacidade do antioxidante quelar o íon Fe^{2+} , prevenindo a formação de Fe^{3+} pela sua oxidação (Adjimani & Asare, 2015). O íon Fe^{2+} reage com a ferrozina formando um complexo vermelho, pelo que quanto mais incolor for a solução maior a atividade antioxidante da amostra (Adjimani & Asare, 2015).

No ensaio da ferrozina não foi possível determinar o valor de IC_{50} na gama de concentrações testadas (1-1000 $\mu g/mL$), ou seja, a concentração de amostra que possui a quantidade de antioxidantes capaz de reduzir em 50% a concentração inicial íões de Fe^{2+} (Tabela 8). Desta forma e em relação a este ensaio, as cervejas estudadas apresentaram baixa capacidade antioxidante ($IC_{50} > 100 \mu g/mL$) (Kuethe & Efferth, 2010).

Analisando outros estudos, no seu trabalho, S. Silva et al. (2022) observaram que a capacidade de quelação dos íões Fe^{2+} , nas cervejas artesanais, variou de $1,6 \pm 0,4\%$ (estilo Special Honey beer) a $113,4 \pm 15,8\%$ (estilo India Pale Ale), enquanto nas cervejas industriais variou entre $7,6 \pm 0,3\%$ (estilo Pilsner) a $23,1 \pm 1,3\%$ (estilo Pilsner), concluindo que a capacidade antioxidante determinada pelo ensaio da ferrozina foi superior nas cervejas artesanais (S. Silva et al., 2022). Além disso, verificaram que as cervejas industriais analisadas possuíam uma capacidade de quelar íões Fe^{2+} significativamente inferior às três cervejas artesanais com melhor resultado no ensaio da ferrozina ($p < 0,05$). Por sua vez, nos estudos de Zhao et al. (2010) e de Zhao et al. (2013) os valores obtidos nos ensaios da ferrozina, para as cervejas industriais do tipo Lager, variou entre $0,12 \pm 0,16$ e $54,57 \pm 0,36 \mu mol$ de equivalentes de EDTA (EDTAE)/L, e $5,36 \pm 0,15-80,89 \pm 0,35 \mu mol$ EDTAE/L, respetivamente (Zhao et al., 2010, 2013).

A diferença dos valores obtidos no ensaio da ferrozina entre cervejas artesanais e industriais pode justificar-se pela utilização de diferentes matérias-primas e diferentes processos de fermentação, que podem influenciar a atividade quelante de metais (Zhao et al., 2010). Além

disso, a variação de valores entre cervejas do mesmo estilo pode também justificar-se pela utilização de diferentes amostras.

Algumas cervejas apresentam uma fraca atividade de quelação de metais, que, no caso do presente estudo, podem conter compostos fenólicos com fraca capacidade de ligação a metais. No seu estudo, Miranda et al. (2000) observaram que as chalconas preniladas e não preniladas, assim como as flavanonas presentes na cerveja e lúpulos não tinham a capacidade de quelar iões cobre, *in vitro* (Miranda et al., 2000). Sabe-se que, mesmo quantidades muito reduzidas de metais como o ferro ou cobre poderão converter o oxigénio molecular em ROS, que depois participam na oxidação da cerveja, resultando em alterações de sabor (Bamforth et al., 1993).

Os resultados dos ensaios antioxidantes variam consideravelmente, mesmo quando se trata da análise da mesma amostra por diferentes métodos, pois cada ensaio de atividade antioxidante baseia-se em distintos antecedentes químicos e mecanismos de reação (H. Zhao, 2014).

4.3.5. Correlação entre Características Físico-Químicas, TPC e Ensaio Antioxidantes

A correlação é um método utilizado para avaliar a associação linear bidirecional entre duas variáveis contínuas (Mukaka, 2012). A correlação é quantificada por meio de um coeficiente de correlação, que varia entre -1 e 1 (Mukaka, 2012). Quando esse coeficiente é igual a zero, indica a ausência de correlação linear entre as variáveis (Mukaka, 2012). Um coeficiente positivo sugere que, à medida que o valor de uma variável aumenta, o valor da outra também tende a aumentar, indicando que as variáveis estão diretamente relacionadas (Mukaka, 2012). Por outro lado, um coeficiente negativo indica que as variáveis estão inversamente relacionadas, ou seja, conforme o valor de uma variável aumenta, o valor da outra tende a diminuir (Mukaka, 2012).

Pela análise da correlação entre o TPC e os ensaios antioxidantes efetuados nas cervejas artesanais e industriais, verificou-se que apenas existe correlação com o ensaio H_2O_2 , sendo esta negativa ($p < 0,05$) (Tabela 9). Este resultado, assim como a falta de correlação entre o TPC e os restantes ensaios antioxidantes, pode ser atribuído à presença de outros compostos antioxidantes, além dos fenólicos, que atuam na neutralização dos radicais livres e na quelação dos iões metálicos (Nardini & Foddai, 2020).

O estudo de S. Silva et al. (2022) corrobora os resultados obtidos, tendo observado a inexistência de correlação entre o TPC e os ensaios antioxidantes (S. Silva et al., 2022). Porém,

são vários os estudos que não vão de encontro ao observado, mencionando a existência de correlação entre o TPC e o poder antioxidante das cervejas, ou seja, correlação-positiva do TPC com os valores do ensaio FRAP e ABTS (Breda et al., 2022; Gouvinhas et al., 2021; Mitić et al., 2014; Nardini & Garaguso, 2020; Pai et al., 2015; Piazzon et al., 2010; Tedesco et al., 2005; Zhao et al., 2010, 2013). Além disso, a literatura menciona a existência de correlação-positiva entre ensaios antioxidantes, nomeadamente, ABTS e FRAP (Mitić et al., 2014; Piazzon et al., 2010).

Tabela 9. Correlação entre parâmetros físico-químicos da cerveja, teor de fenólicos totais (TPC) e ensaios antioxidantes.

	ABV	EBC	IBU	pH	TA	TAR	TPC	ABTS	H ₂ O ₂	FRAP
ABV	1,000	0,284	0,607*	0,373	0,726*	0,612*	0,159	0,322	0,028	0,174
EBC	-	1,000	-0,062	0,053	0,686*	0,905**	0,623	-0,356	-0,761*	0,324
IBU	-	-	1,000	0,005	0,293	0,224	-0,064	0,483	0,149	0,187
pH	-	-	-	1,000	0,080	0,054	-0,143	-0,086	0,359	0,088
TA	-	-	-	-	1,000	0,851**	0,227	0,122	-0,483	0,113
TAR	-	-	-	-	-	1,000	0,625*	-0,110	-0,634*	0,244
TPC	-	-	-	-	-	-	1,000	-0,304	-0,621*	0,099
ABTS	-	-	-	-	-	-	-	1,000	0,323	-0,015
H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000	-0,218
FRAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000

ABV: *Alcohol by Volume*; EBC: Cor; IBU: Amargor; TA: Acidez Total; TAR: Teor de Açúcares Redutores; TPC: Teor de Fenólicos Totais; ABTS: Ensaio de Neutralização do ABTS; H₂O₂: Ensaio Peróxido de Hidrogénio; FRAP: Ensaio do Poder Antioxidante de Redução do Ferro; *A correlação é significativa no nível 0,05 (bicaudal); ** A correlação é significativa no nível 0,01 (bicaudal).

Pela tabela 9, existe correlação entre os parâmetros físico-químicos das cervejas. O teor de álcool correlaciona-se positivamente com o amargor, a acidez total e o TAR ($p < 0,05$). Por sua vez, a cor correlaciona-se positivamente com a acidez total ($p < 0,05$) e o TAR ($p < 0,01$). A acidez total correlaciona-se positivamente com o TAR ($p < 0,01$). Além disso, os parâmetros físico-químicos correlacionam-se com o TPC e ensaios antioxidantes. Em particular, a acidez total e o TAR correlacionam-se positivamente com o TPC ($p < 0,05$), o TAR correlacionam-se negativamente com os valores do ensaio do H₂O₂ ($p < 0,05$), e a cor correlaciona-se negativamente com os valores do ensaio do H₂O₂, ($p < 0,05$). No seu estudo, S. Silva et al. (2022) também observaram que o teor de álcool esteve relacionado positivamente com o amargor,

acidez total e TAR ($p < 0,01$). A acidez total e TAR também se correlacionaram positivamente ($p < 0,01$) (S. Silva et al., 2022).

Destaca-se a ausência de correlação significativa entre o teor de etanol e o TPC. Este resultado não vai de encontro ao esperado, uma vez que a literatura menciona que o etanol tem a capacidade de aumentar a solubilidade dos compostos fenólicos em comparação com a água, aumentando a extração das matérias-primas durante o processo de produção da cerveja (Granato et al., 2011; S. Silva et al., 2022). Além disso, também não houve correlação entre a cor e o TPC, mas a literatura indica que cervejas mais escuras tendem a ter maiores níveis de compostos fenólicos (Saura-Calixto et al., 2009; S. Silva et al., 2022). Gouvinhas et al. (2021) estudaram 23 cervejas comerciais portuguesas, tendo observado que maiores TPC e TFC correlacionavam-se positivamente com cervejas pretas e escuras analisadas.

Desta forma, a inclusão de informações sobre o teor de álcool, cor e amargor nos rótulos das cervejas pode ser vantajosa para os consumidores, podendo ajudar a selecionar cervejas com maior presença de compostos fenólicos e que atendam melhor às suas preferências sensoriais.

Salienta-se ainda que nem sempre há linearidade entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos podem ter diferentes origens, como maltes e lúpulos, com perfis fenólicos distintos (Spagnuolo et al., 2014). Além disso, a cerveja possui outros antioxidantes, nomeadamente, carotenóides, tocoferóis, melanoidinas e ácido ascórbico que também contribuem para a capacidade antioxidante global das cervejas (Nardini & Foddai, 2020). Por exemplo, no estudo de Pastoriza e Rufián-Henares (2014) o teor de melanoidinas foi de aproximadamente 8,7% na cerveja do estilo Pilsner (Pastoriza & Rufián-Henares, 2014), mas no estudo de Zhao et al. (2013) realizado em 40 cervejas do estilo Lager o teor de melanoidinas atingiu um valor de 10,3% (Zhao et al., 2013). Desta forma, a determinação da composição específica dos polifenóis é crucial para traçar o perfil fenólico da cerveja (Spagnuolo et al., 2014).

4.4. Incorporação de Extratos de Cereja Variedade “Lapins” na Cerveja

Como já foi referido, a cerveja contém quatro ingredientes principais: o malte, água, lúpulo e levedura, mas também ingredientes adicionais como frutos, plantas e especiarias ou substratos fermentáveis alternativos que podem ser utilizados em diferentes fases de produção (Nedyalkov et al., 2023).

O objetivo desta diversificação no fabrico artesanal de cerveja, por exemplo, através da incorporação de novos ingredientes, é obter produtos com aromas, cores e sabores únicos, mas também com benefícios para a saúde, através do aumento da concentração de compostos bioativos que vão sendo extraídos durante a fermentação secundária e maturação das cervejas (Nardini & Garaguso, 2020; Nedyalkov et al., 2023; Tirado-Kulieva et al., 2023). Uma gama tão ampla de matérias-primas utilizadas na produção de cervejas oferece uma oportunidade para a conquista de novos mercados, assim como para responder à demanda de grupos de consumidores menos convencionais. Nos últimos anos, o mercado de cervejas, identificadas como funcionais, com funções melhoradas para a saúde e/ou com um novo sabor aumentou significativamente (Borşa et al., 2022). Desta forma, as cervejas produzidas pela adição de frutos, extratos ou aromas estão a tornar-se populares em todo o mundo (Nedyalkov et al., 2023).

À medida que os consumidores se tornam mais conscientes dos impactos ambientais e do património cultural, há uma procura crescente de produtos que enfatizem o abastecimento local e práticas sustentáveis. Um exemplo dessas práticas sustentáveis é o uso de ingredientes locais no fabrico de cerveja (Hempel & Hamm, 2016). Como referido por Cunha et al. (2023), a produção de cerveja artesanal incorporando frutas locais e subprodutos agroindustriais é um assunto de interesse para os consumidores que procuram sabores novos e únicos, ao mesmo tempo que valorizam o valor nutricional e os benefícios ambientais da cerveja, abordando preocupações de sustentabilidade e economia circular (Cunha et al., 2023). Desta forma, no presente trabalho, optou-se pela incorporação de extratos de cereja variedade “Lapins”, da região de Resende (Portugal), na cerveja. Após a produção dos extratos a utilizar (aquoso e etanólico) determinou-se o TPC e atividade antioxidante dos mesmos, antes e após a incorporação na cerveja.

A cereja-doce, *P. avium*, é um fruto de elevado valor económico e de grande importância nutricional, amplamente distribuído por todo o mundo, sendo igualmente conhecida pela sua elevada capacidade antioxidante associada à presença de compostos fenólicos (Chockchaisawasdee et al., 2016; Vilas-Boas et al., 2020). A variedade “Lapins” é muito produtiva e tem atraído interesse comercial devido ao seu grande tamanho e resistência à chuva (Pilli et al., 2019).

4.4.1. Determinação do TPC nos Extratos de Cereja Variedade “Lapins”

No presente estudo, procedeu-se à determinação do TPC no EAC e no EEC. O extrato etanólico 70% (V/V) obteve um TPC significativamente superior ao extrato aquoso ($5,1 \pm 0,0$ mg GAE/g de extrato e $3,6 \pm 0,0$ mg GAE/g de extrato, respetivamente) ($p < 0,05$).

Os estudos existentes na literatura relativos à determinação do TPC em extratos de cereja são escassos e os seus resultados vêm expressos em peso fresco de cereja (PF), impossibilitando, deste modo, a comparação direta com os resultados obtidos neste estudo.

Vavoura et al. (2015) avaliaram o TPC em quatro extratos metanólicos (80:20 (V/V)) de cereja *P. avium* (variedades “Canada giant”, “Ferrovia”, “Lapins” e “Skeena”). O TPC variou entre $95,14 \pm 3,64$ mg GAE/100 g PF (variedade “Canada giant”) e $170,35 \pm 3,52$ mg GAE/100 g PF (variedade “Skeena”), tendo a cereja variedade “Lapins” um valor de TPC de $135,86 \pm 13,94$ mg GAE/100 g PF (Vavoura et al., 2015). Por sua vez, no estudo de Usenik et al. (2008) analisaram o extrato metanólico de 13 variedades de *P. avium* (variedades “Badacsony”, “Burlat”, “Early Van Compact”, “Fercer”, “Fernier”, “Ferprime”, “Lala Star”, “Lapins”, “Noire de Meched”, “Sylvia”, “Vesseaux”, “Vigred” e “Ferrador”), encontrando-se o TPC numa faixa de $44,3 \pm 3,42$ mg GAE/100 g PF (variedade “Lapins”) a $87,9 \pm 9,11$ mg GAE/100 g PF (variedade “Ferprime”) (Usenik et al., 2008). No estudo de Hu et al. (2021) analisaram o extrato etanólico 70% de quatro variedades de *P. avium* (variedades “Bing”, “Ron’s”, “Merchant” e “Lapins”), constatando que a variedade “Ron’s” apresentou o menor TPC ($0,87 \pm 0,09$ mg GAE/g PF) e a variedade “Lapins” o maior valor ($1,73 \pm 0,90$ mg GAE/g PF) (Hu et al., 2021).

O TPC da cereja variedade “Lapins” obtido no estudo de Hu et al. (2021) é superior ao obtido por Usenik et al. (2008) e Vavoura et al. (2015) (Hu et al., 2021; Usenik et al., 2008; Vavoura et al., 2015). A diferença de valores de TPC dentro da mesma variedade de cereja-doce e entre variedades distintas pode dever-se a alterações na composição química do fruto, face às condições pré-colheita, nomeadamente, práticas agrícolas, maturação, condições climáticas e épocas de colheita e de acordo com as condições pós-colheita, como condições de armazenamento e transporte (Acero et al., 2019; Faienza et al., 2020). Por exemplo, a gestão do pomar, como a poda de verão, melhora a qualidade das cerejas ao aumentar o teor de ácido ascórbico, favorecido pela alta intensidade de luz e ao promover o acúmulo de antocianinas e fenólicos totais devido às temperaturas elevadas (Wang, 2006). Além disso, a irrigação por gotejamento também contribui para o aumento dos níveis de açúcar da fruta e do TPC (Correia et al., 2017).

Por sua vez, Serrano et al. (2005) avaliaram qual a data ótima de colheita de *P. avium* variedade 4-70 para garantir que as cerejas chegam aos consumidores com as máximas propriedades funcionais e nutricionais. Assim, avaliaram os parâmetros: cor, textura, açúcares, ácidos orgânicos, atividade antioxidante total, TPC, antocianinas totais e teor de ácido ascórbico, em 14 estádios do processo de maturação da cereja (Serrano et al., 2005). Os resultados indicaram que a colheita das cerejas-doces deve ocorrer no estádio 12, uma vez que apresenta os melhores atributos de qualidade organoléptica, nutricional e funcional. Além disso, atestaram que o ácido ascórbico, a atividade antioxidante total e o TPC diminuíram nos estádios iniciais de desenvolvimento, mas aumentaram exponencialmente a partir do estádio 8, coincidindo com a acumulação de antocianinas e o escurecimento do fruto (Serrano et al., 2005). Assim sendo, os compostos fenólicos, concentrados na casca da fruta, aumentam durante o amadurecimento (Correia et al., 2017; B. Gonçalves et al., 2007).

No que concerne às alterações na composição de compostos fenólicos da cereja-doce alguns estudos identificaram diferenças entre variedades (Clodoveo et al., 2023; Hu et al., 2021; Martini et al., 2017). Martini et al. (2017) avaliaram o perfil fenólico de seis variedades de *P. avium* ("Della Marca", "Celeste", "Bigarreau", "Durone Nero", "Lapins" e "Moretta"), e os ácidos hidroxicinâmicos foram a classe de compostos fenólicos predominante na maioria das variedades, exceto na variedade "Lapins" e na variedade "Della Marca", onde as antocianinas (ex: cianidina-3-rutinósido) e os flavan-3-óis (ex: epicatequina), respectivamente, foram mais representativos (Martini et al., 2017). Clodoveo et al. (2023) avaliaram as variedades "Ferrovia", "Sweetheart" e "Lapins" de *P. avium*, constatando que a variedade "Sweetheart" apresentou maior concentração de flavanóis e antocianinas, especialmente procianidina B1 e cianidina-3-O-rutinósido, enquanto os flavonóis foram mais abundantes na variedade "Lapins" (quercetina-3-O-rutinósido) e "Ferrovia" (quercetina-4-O-glicósido). Além disso, as variedades "Sweetheart" e "Lapins", revelaram possuir as maiores quantidades de ácidos hidroxicinâmicos (Clodoveo et al., 2023). Por fim, no estudo de Hu et al. (2021) realizado em quatro variedades de *P. avium* ("Bing", "Ron's", "Merchant" e "Lapins"), a variedade "Lapins" apresentou o maior número de compostos únicos entre as quatro variedades, como por exemplo, o ácido gálico 4-O-glicósido (ácido hidroxibenzóico), o ácido cafeico 3-O-glucuronídeo (ácido hidroxicinâmico), a diosmina (flavona) e o 3-O-xilosil-glicósido de kaempferol (flavonol) (Hu et al., 2021).

Os estudos de Acero et al. (2019) e Hayaloglu e Demir (2015) corroboram a existência de diferentes TPC dentro da mesma variedade, com valores para a variedade "Van" de $284,48 \pm$

3,07 mg GAE/100 g PF e $58,31 \pm 10,56$ mg GAE/100 g PF, respetivamente. Acero et al. (2019) verificaram que os principais compostos fenólicos presentes nas variedades "Navalinda", "Jarandilla", "Pico Colorado", "Van" e "Sunburst" de *P. avium*, pertenciam ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, antiocianinas e flavonóis.

A escolha do solvente utilizado também influencia a eficiência de extração dos compostos fenólicos (Catalão, 2016). Nizioł-Lukaszewska (2018) analisaram o extrato aquoso e aquoso-glicerínico da variedade "Burlat" da espécie *P. avium*, tendo a extração com água resultado na menor eficiência de extração de compostos fenólicos face à extração de água com glicerina. Estes resultados vão de encontro aos obtidos no presente estudo, no qual a extração etanólica obteve um maior TPC ($5,1 \pm 0,0$ mg GAE/g). A extração de compostos fenólicos é vantajosa, uma vez que estes compostos oferecem potenciais benefícios à saúde, nomeadamente, capacidade antitumoral, capacidade anti-inflamatória e propriedades de neuroproteção, dada a sua capacidade antioxidante que permite a eliminação de radicais livres (Vilas-Boas et al., 2020).

Por sua vez, o estudo de Vilas-Boas et al. (2020) observou que a utilização de diferentes métodos extrativos influenciou a capacidade de extração de compostos fenólicos da variedade "Saco" da espécie *P. avium*, tendo realizado extração convencional (etanol/água (50 : 50 (V/V)) com 0,1% de HCl), extração convencional com elevada temperatura (65 ± 1 °C) e extração assistida por microondas e por ultrassons (etanol/água (50 : 50 (V/V)) com 0,1% de HCl), obtendo um TPC de $8,75 \pm 0,81$ mg GAE/g de extrato seco (ES), $7,11 \pm 0,33$ mg GAE/g ES, $12,65 \pm 0,81$ mg GAE/g DE e $7,16 \pm 0,81$ mg GAE/g ES, respetivamente. A determinação da composição fenólica da variedade "Saco" permitiu apurar que os principais compostos fenólicos pertenciam ao grupo dos ácidos hidroxinâmicos, flavan-3-óis e antiocianinas (Vilas-Boas et al., 2020).

No estudo de Kelebek e Selli (2011), os compostos fenólicos presentes nas variedades "Van", "Noir de Guben", "Larian" e "0-900 Ziraat" de *P. avium* são semelhantes aos encontrados noutras variedades de cereja-doce previamente mencionadas, ou seja, possuem ácido hidroxicinâmicos, antiocianinas, flavan-3-óis e o flavonol rutina (Kelebek & Selli, 2011).

4.4.2. Determinação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Cereja Variedade "Lapins"

A atividade antioxidante do EAC e do EEC foi determinada por quatro ensaios antioxidantes, ou seja, o ensaio ABTS, H₂O₂, FRAP e da ferrozina, estando os dados presentes na tabela 10.

Tabela 10. Resultados da capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins”, pelos ensaios ABTS, H₂O₂, FRAP e ferrozina.

Extrato de Cereja	ABTS (IC ₅₀)*	H ₂ O ₂ (IC ₅₀)**	FRAP (μmol TE/g de extrato)	Ferrozina (IC ₅₀ ***)
EAC	192,3 ± 1,0 ^a	143,9 ± 4,3 ^a	23,4 ± 0,0 ^a	Sem IC ₅₀
EEC	108,6 ± 1,7 ^a	72,6 ± 1,9 ^a	33,3 ± 0,0 ^a	

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. EAC: Extrato Aquoso de Cereja Variedade “Lapins”; EEC: Extrato Etanólico de Cereja Variedade “Lapins”; TE: Equivalentes de Trolox; *, ** e ***: Concentração expressa em μg/mL necessária para redução de 50% do radical ABTS^{•+}, das moléculas de H₂O₂, e dos iões de Fe²⁺, respetivamente; ^a Significativamente diferente entre si (*p* < 0,05).

Comparando os dois extratos de cereja para os quatro ensaios realizados e com os valores obtidos, o EEC apresentou melhor atividade antioxidante, com valores de IC₅₀ significativamente menores em todos os ensaios (*p* < 0,05). Em relação ao extrato etanólico, com melhores resultados no presente estudo, os valores de IC₅₀ obtidos mostraram-se menos eficientes (72,6 ± 1,9 μg/mL para o ensaio do H₂O₂ e 108,6 ± 1,7 μg/mL para o ABTS) do que os extratos hidroetanólicos do fruto da cereja-doce obtidos no estudo de A. C. Gonçalves et al. (2017) (IC₅₀ variou entre 12,12 ± 0,37 e 43,03 ± 0,53 μg/mL de extrato seco para o ensaio do DPPH).

No caso do ensaio ABTS, o EEC apresentou um valor de IC₅₀ significativamente inferior ao EAC (108,6 ± 1,7 μg/mL e 192,3 ± 1,0 μg/mL, respetivamente) (*p* < 0,05). Contudo ambos os extratos apresentaram baixa capacidade antioxidante, dado possuírem IC₅₀ > 100 μg/mL (Kuefe & Efferth, 2010). Relativamente a estudos de outros autores, Clodoveo et al. (2023) e Hu et al. (2021) também efetuaram o ensaio ABTS na cereja variedade “Lapins”, obtendo o valor de 2,6 ± 0,4 mg TE/g ES de cerejas e 0,37 ± 0,01 mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/g PF, respetivamente. Por sua vez, Kelebek e Selli (2011) avaliaram o extrato metanólico com 1% de HCl e 1% de 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol de quatro variedades de *P. avium* (“Van”, “Noir de Guben”, “Larian” e “O-900 Ziraat”) tendo obtido valores no ensaio ABTS entre 3,02 ± 0,08 μM TE/g PF (“Van”) e 7,75 ± 0,12 μM TE/g PF (variedade “Noir Guben”). No estudo de Hayaloglu e Demir (2015) avaliaram o extrato etanólico de 12 variedades de *P. avium* (“Belge”, “Bing”, “Dalbasti”, “Durona di Cesena”, “Lambert”, “Merton Late”, “Starks Gold”, “Summit”, “Sweetheart”, “Van”, “Vista”, e “O-900 Ziraat”) constatando que os valores no ensaio ABTS variaram de 4,49 ± 0,04 mg TE/g PF (variedade “Starks Gold”) a 6,15 ± 0,04 mg TE/g PF (variedade “Dalbasti”).

A razão para a diferença nos valores obtidos no ensaio ABTS dentro da mesma variedade de cereja-doce e entre variedades pode resultar da utilização de diferentes métodos de extração, a utilização de diferentes unidades em que os resultados são expressos, bem como condições de pré e pós-colheita (Faienza et al., 2020; Hu et al., 2021).

No caso do ensaio do H_2O_2 , o EEC apresentou um valor de IC_{50} significativamente inferior ao EAC ($72,6 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$ e $143,9 \pm 4,3 \mu\text{g/mL}$, respetivamente) ($p < 0,05$), e uma moderada atividade antioxidante ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) (Kuete & Efferth, 2010). O H_2O_2 é considerado um agente oxidante fraco e pode inativar algumas enzimas diretamente, geralmente por oxidação de grupos tiol (-SH). Pode atravessar rapidamente as membranas celulares e uma vez dentro da célula, o H_2O_2 reage com iões Fe^{2+} e Cu^{2+} (ião cúprico) para formar o $\cdot\text{OH}$, causando muitos efeitos tóxicos. É, portanto, biologicamente vantajoso para as células controlarem a quantidade de H_2O_2 que se vai acumulando (B et al., 2013). No estudo de Bhattacharjee et al. (2016) utilizaram-se diferentes concentrações de extrato etanólico (70% V/V) do fruto de *P. avium*, resultando num aumento da percentagem de inibição do H_2O_2 , com um valor de IC_{50} de $22,84 \pm 2,54 \mu\text{g/mL}$.

Relativamente ao ensaio do FRAP o EEC também revelou uma capacidade antioxidante significativamente superior ao EAC ($p < 0,05$), tendo-se obtido o valor de $33,3 \pm 0,0 \mu\text{TE/g}$ de extrato e $23,4 \pm 0,0 \mu\text{TE/g}$ de extrato, respetivamente. No estudo de Hayaloglu e Demir (2015) apuraram que o valor mais elevado no ensaio FRAP foi observado na variedade "Durona di Cesena" ($1,61 \text{ mg} \pm 0,12 \text{ TE/g PF}$) e o mais baixo na variedade "Bing" ($0,44 \pm 0,08 \text{ mg TE/g PF}$), pelo que se atesta também a diferença de valores no ensaio FRAP entre diferentes variedades. Estas variedades de *P. avium* apresentam diferenças na sua composição-química, verificando-se que a variedade "Bing" apresenta valores de compostos fenólicos (ex: rutina e ácido neoclorogénico) e de antocianidinas (ex: cianidina-3-O-rutinósido e peonidina-3-O-rutinósido) significativamente superior à variedade "Durona di Cesena" ($p \leq 0,05$) (Hayaloglu & Demir, 2016). Hayaloglu e Demir (2016) atestaram que a única superioridade significativa da variedade "Durona di Cesena" em relação à variedade "Bing" foi na concentração de (-)-epicatequina, composto fenólico ($p \leq 0,05$).

Em relação às diferentes variedades de cereja-doce, no seu estudo, Martini et al. (2017) avaliaram a atividade antioxidante de extratos ricos em polifenóis, de seis variedades de cereja-doce. As variedades "Lapins" e "Moretta" demonstraram uma atividade de eliminação do radical ABTS e do FRAP significativamente maior, em comparação com as outras variedades (Martini et al., 2017). Desta forma, a cereja-doce parece ter potencial biológico, nomeadamente a nível

antioxidante, podendo a variedade “Lapins” vir a ser considerada promissora como um alimento funcional, com aplicação na saúde humana.

Por fim, no ensaio da ferrozina não foi possível determinar o valor de IC_{50} na gama de concentrações testadas (1-1000 $\mu\text{g/mL}$), o que significa que a concentração de EAC e de EEC necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de íons Fe^{2+} não foi alcançada nas concentrações avaliadas (Tabela 10).

4.5. Toxicidade Hepática das Cervejas e dos Extratos de Cereja Variedade “Lapins”

No presente trabalho as células HepG2 foram incubadas com as cervejas artesanais e industriais em solvente aquoso e em solvente etanólico correspondente à percentagem ABV original, assim como com o EAC e o EEC, por 24 horas e 48 horas, de forma a averiguar a sua citotoxicidade (viabilidade celular inferior a 80%) (Figuras 8-11) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

As linhas celulares de hepatoma são frequentemente utilizadas como alternativas *in vitro* aos hepatócitos humanos primários. As células HepG2 mantêm diversas funções especializadas dos hepatócitos humanos normais, sendo consideradas como um modelo adequado para estudos *in vitro* do metabolismo de xenobióticos e da toxicidade hepática (A. Gonçalves et al., 2021; Lima et al., 2006).

Quando os efeitos das cervejas artesanais e industriais em solvente aquoso e em solvente etanólico correspondente à percentagem ABV original foram analisados, durante 24 horas e 48 horas, em células HepG2, verificou-se uma tendência no aumento da citotoxicidade à medida que a concentração de amostra aumenta (Figuras 8-11) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Além disso, verificou-se que a viabilidade celular nas 11 cervejas analisadas variou entre 62,6% e 135,5% às 24 horas e entre 53,9% a 148,3% às 48 horas.

Na incubação durante 24 horas com as cervejas artesanais em solvente aquoso verificou-se que apenas na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ nenhuma das cervejas provocou diminuição da viabilidade celular de forma significativa em comparação ao controlo (células sem extrato), enquanto que nas cervejas artesanais em solvente etanólico verificou-se que nenhuma das cervejas apresentou diminuição da viabilidade celular de forma significativa em comparação ao controlo até à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, nenhuma das amostras de cerveja

artesanal, em solvente aquoso e etanólico, apresentou citotoxicidade até à concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Realça-se que, às 24 horas, apenas as cervejas artesanais BP-N (estilo Brown Porter), IS-N (estilo Imperial Stout) e P-L (estilo Pilsner), em solvente aquoso, e as cervejas L-N (estilo Lager) e P-L (estilo Pilsner), em solvente etanólico, não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (valores de viabilidade celular acima dos 80%) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Na incubação durante 48 horas das cervejas artesanais em solvente aquoso e etanólico constatou-se que apenas na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nenhuma cerveja apresentou uma diminuição da viabilidade celular significativa em comparação ao controlo. À semelhança da incubação durante 24 horas, nenhuma das amostras possui citotoxicidade até à concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

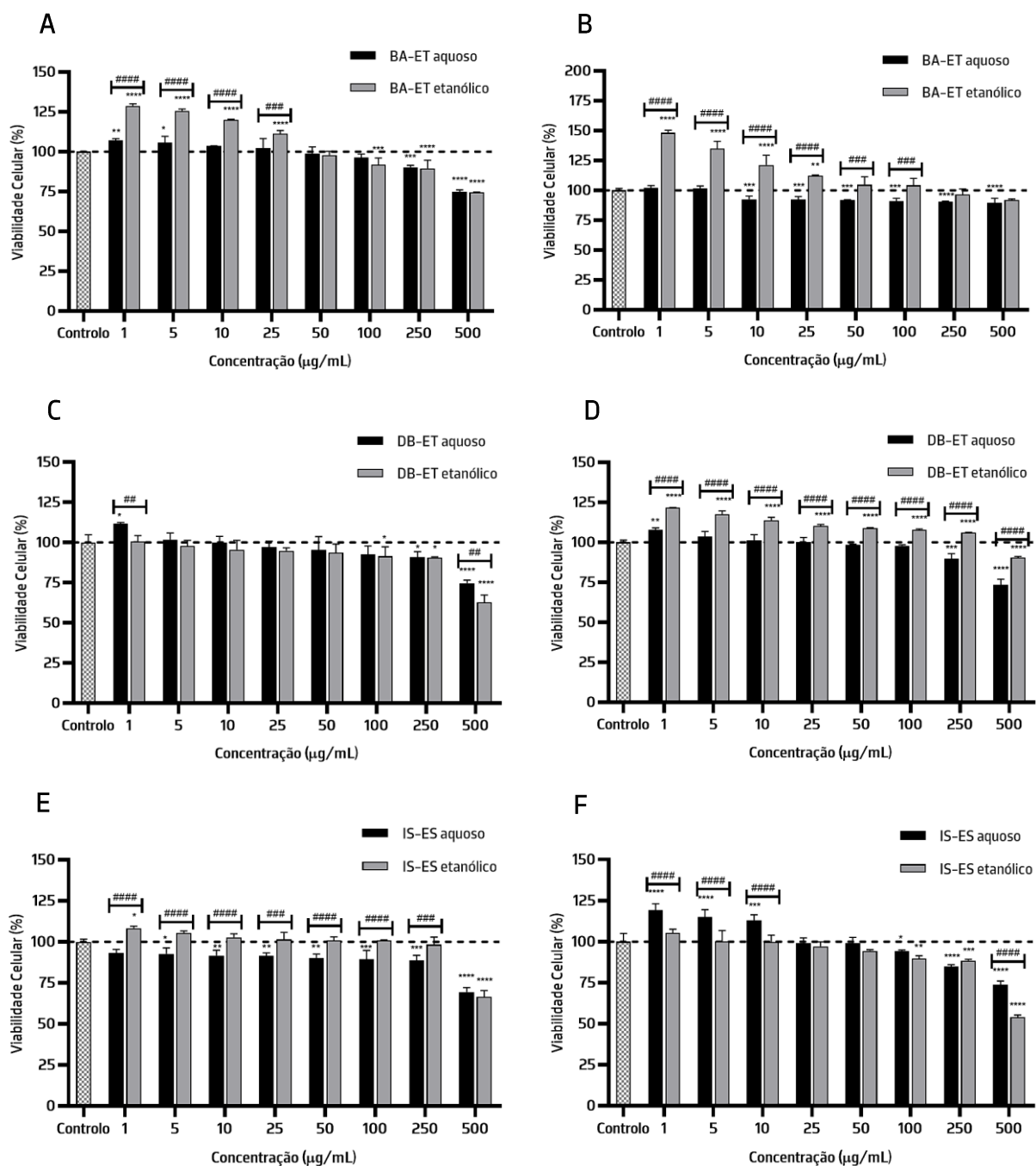


Figura 8. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja BA-ET, DB-ET e IS-ES, em células HepG2. Cerveja BA-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,5% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja DB-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,8% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja IS-ES em solvente aquoso e em solvente etanólico (9,1% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

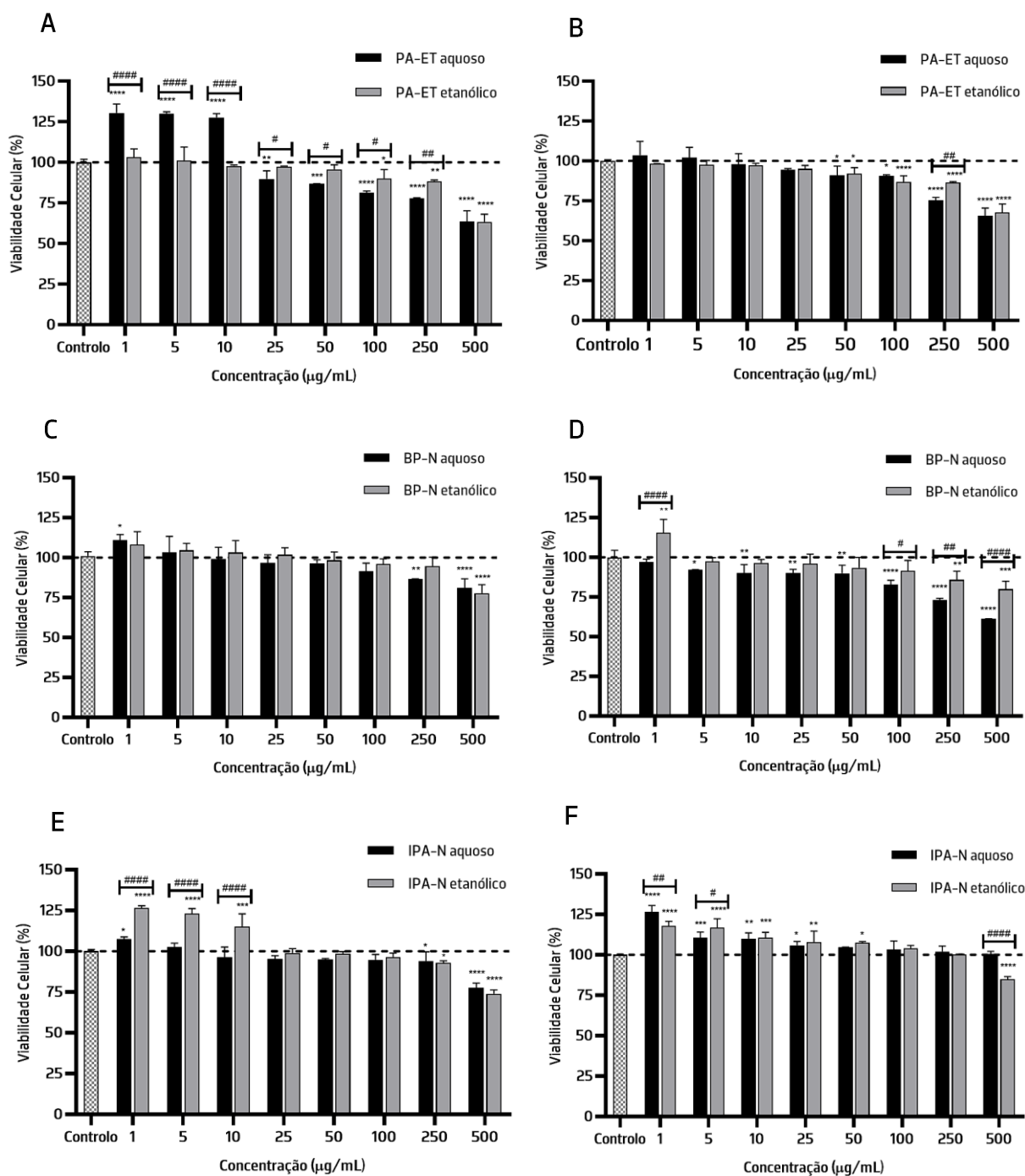


Figura 9. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja PA-ET, BP-N e IPA-N, em células HepG2. Cerveja PA-ET em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,0% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja BP-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (4,8% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja IPA-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (6,0% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

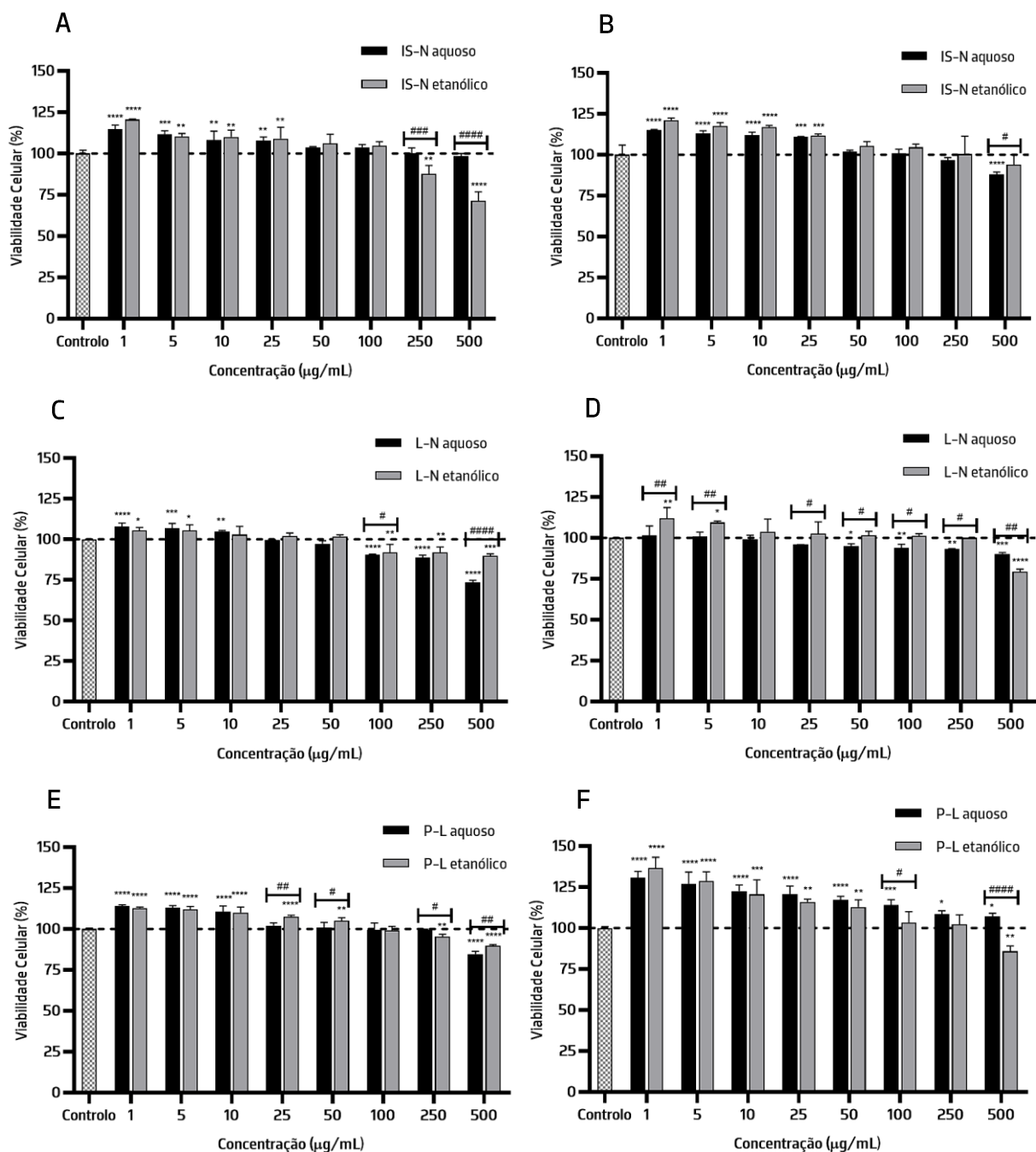


Figura 10. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja IS-N, L-N e P-L, em células HepG2. Cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (8,5% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja L-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D); Cerveja P-L em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (E) e 48 horas (F). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

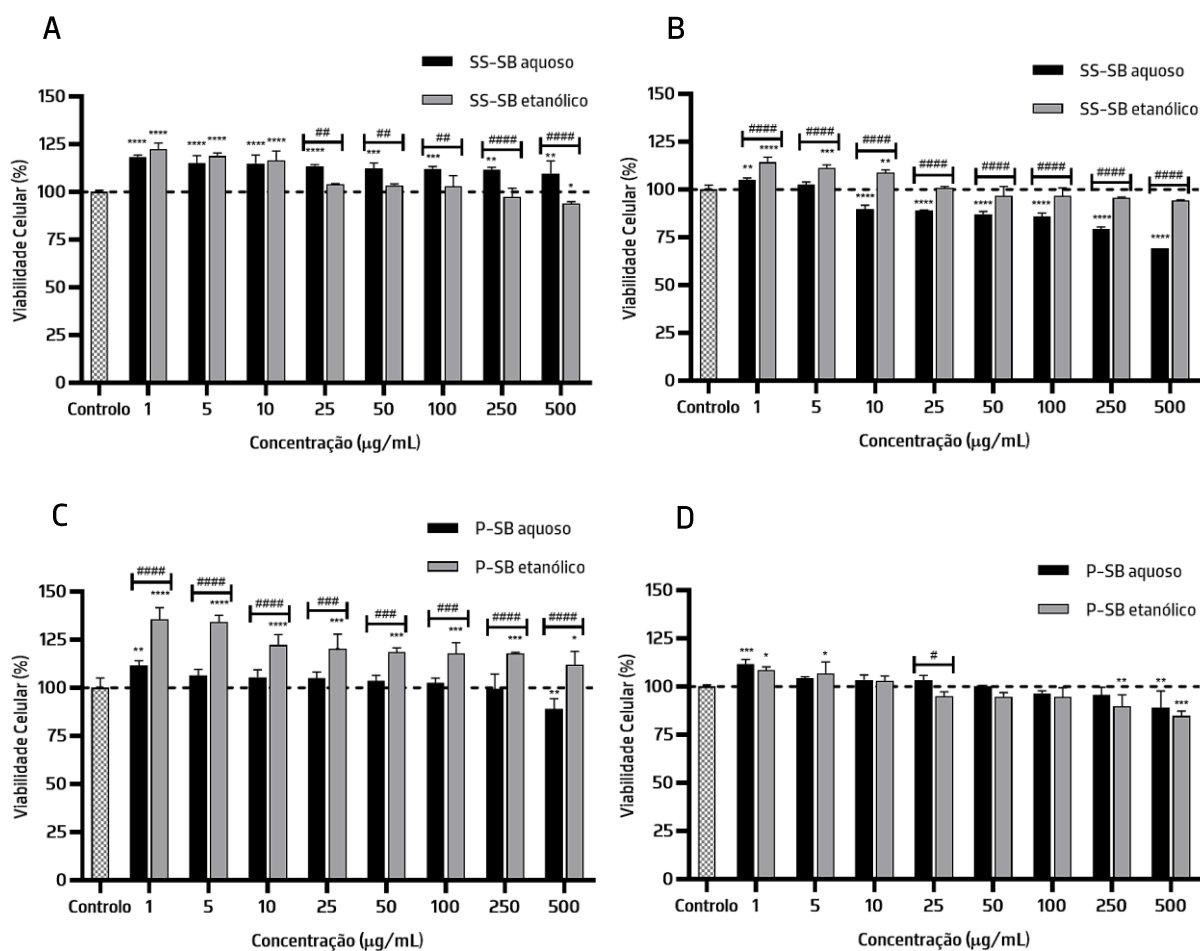


Figura 11. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações da cerveja SS-SB e P-SB, em células HepG2. Cerveja SS-SB em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,0% (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B); Cerveja P-SB em solvente aquoso e em solvente etanólico (5,2% (V/V)), após 24 horas (C) e 48 horas (D). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

As cervejas artesanais IPA-N (estilo India Pale Ale), IS-N (estilo Imperial Stout), L-N (estilo Lager), BA-ET (estilo Brown Ale) e P-L (estilo Pilsner), em solvente aquoso, e as cervejas artesanais DB-ET (estilo Dubble Belga), BP-N (estilo Brown Porter), IPA-N (estilo India Pale Ale), IS-N (estilo Imperial Stout), BA-ET (estilo Brown Ale) e P-L (estilo Pilsner), em solvente etanólico, não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, às 48 horas (valores de viabilidade celular acima dos 80%) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Na incubação durante 24 horas com as cervejas industriais em solvente aquoso e etanólico não se verificou diminuição da viabilidade celular de forma significativa em comparação ao controlo até à concentração de 250 µg/mL, e não se verificou a existência de citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 11-A e 11-C) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Por sua vez, nas cervejas industriais em solvente aquoso, com 48 horas de incubação, nenhuma mostrou uma redução significativa na viabilidade celular em comparação ao controlo até à concentração de 5 µg/mL. Em solvente etanólico, verificou-se que não houve uma diminuição significativa da viabilidade celular até a concentração de 100 µg/mL. De entre as cervejas industriais apenas a cerveja SS-SB (estilo Sweet Stout) em solvente aquoso revelou possuir citotoxicidade a partir da concentração de 250 µg/mL (Figuras 11-B e 11-D) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

De salientar que, em relação à citotoxicidade, as cervejas artesanais e industriais equiparam-se, dado só possuírem citotoxicidade a partir da concentração de 250 µg/mL, à exceção das cervejas industriais com incubação de 24 horas que revelaram não possuir citotoxicidade nas concentrações analisadas (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Além disso, destaca-se que todas as cervejas artesanais espanholas, incubadas por 24 horas, exibiram citotoxicidade em pelo menos uma das concentrações testadas (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). No entanto, após 48 horas de incubação, apenas as cervejas artesanais espanholas DB-ET (estilo Dubble Belga) e BA-ET (estilo Brown Ale), em solvente aquoso, e BA-ET (estilo Brown Ale), em solvente etanólico, não revelaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Quando comparadas duas concentrações semelhantes, verificou-se que, após 24 horas de incubação, sete cervejas em solvente etanólico (BA-ET, estilo Brown Ale; IS-ES e IS-N, estilo Imperial Stout; SS-SB, estilo Sweet Stout; IPA-N, estilo India Pale Ale; L-N, estilo Lager; P-SB, estilo Pilsner) e, após 48 horas, também sete cervejas em solvente etanólico (BA-ET, estilo Brown Ale; BP-N, estilo Brown Porter; DB-ET, estilo Dubble Belga; IS-N, estilo Imperial Stout; SS-SB, estilo Sweet Stout; L-N, estilo Lager; P-L, estilo Pilsner) possuíam viabilidade celular significativamente superior às cervejas em solvente aquoso, ($p < 0,05$), (Figuras 8-11). O facto da viabilidade celular aumentar na presença de etanol pode ser justificado pelo efeito de hormese que se verifica no consumo moderado de cerveja, ou seja, na capacidade de baixas concentrações de etanol terem efeitos benéficos, não despoletando stress oxidativo, que é comum aquando do

consumo excessivo de etanol (Caon et al., 2021; Y.-J. Lee et al., 2018). Além disso, os compostos antioxidantes presentes na cerveja, nomeadamente os compostos fenólicos, pelas suas propriedades químicas e biológicas, podem contribuir para a hepatoproteção contra o efeito do etanol em baixas doses (Caon et al., 2021; Y.-J. Lee et al., 2018).

A cerveja artesanal que demonstrou ser a mais promissora na atividade antioxidante foi a IS-N (estilo Imperial Stout), com valores de IC_{50} de $80,1 \pm 1,1$ e $27,0 \pm 1,5$ $\mu\text{g/mL}$ para o ensaio do ABTS e H_2O_2 , respetivamente, e valores para o FRAP de $44,4 \pm 0,0$ $\mu\text{TE/g}$ de extrato; tendo ainda apresentado o segundo melhor TPC ($8,3 \pm 0,2$ mg GAE/g de extrato). Além disso, e no caso da avaliação da citotoxicidade, a cerveja IS-N em solvente aquoso apresentou uma viabilidade celular entre 98,3% e 114,7%, após 24 horas de incubação. Após 48 horas de incubação, a viabilidade variou de 86,5% a 113,4% na cerveja em solvente aquoso e de 94,0% a 121,0% em solvente etanólico. Ou seja, sempre acima de 80%, nas condições relatadas (Figuras 10-A e 10-B). Desta forma, e face aos resultados obtidos, foi a cerveja escolhida para a incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins".

A cerveja IS-N em ambos os solventes demonstrou ter a capacidade de aumentar a viabilidade celular em comparação com o controlo até à concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, sendo que quando as células foram incubadas por 24 horas, o aumento foi significativo com $p < 0,01$, e quando a incubação foi de 48 horas, o nível de significância foi superior, com $p < 0,001$.

A cerveja IS-N em solvente etanólico na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação com o controlo ($p < 0,01$), na incubação durante 24 horas. Esta redução é ainda mais pronunciada quando comparada com a mesma concentração de cerveja IS-N em solvente aquoso ($p < 0,001$). Na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, observou-se uma diminuição ainda maior na viabilidade celular, com um nível de significância de $p < 0,0001$, pelo que se verifica a existência de citotoxicidade, dado a viabilidade celular ser inferior a 80% (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Por sua vez, na incubação durante 48 horas, a cerveja IS-N em solvente aquoso na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu significativamente a viabilidade celular em comparação ao controlo ($p < 0,0001$), não apresentando citotoxicidade, (Figura 10-B) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Esta redução de viabilidade celular é menos pronunciada quando comparada com a mesma concentração de IS-N em solvente etanólico ($p < 0,05$).

Assim sendo, apurou-se que a cerveja IS-N demonstrou não só ter maior capacidade antioxidante entre as cervejas analisadas, mas também capacidade promissora no aumento da

viabilidade celular até à concentração de 25 µg/mL ($p < 0,01$), revelando ter toxicidade hepática apenas em solvente etanólico, na incubação durante 24 horas na concentração de 500 µg/mL.

Ao analisar os efeitos dos extratos aquoso e etanólico a 70% (V/V) da cereja variedade "Lapins" durante a incubação de 24 horas, observa-se que a viabilidade celular variou entre 91,2% e 125,1% para o extrato aquoso, e entre 65,4% e 118,3% para o extrato etanólico. Regra geral, o EAC aumentou a viabilidade celular com o aumento da concentração (Figura 12-A). Por sua vez, o EEC, e de forma semelhante às cervejas, diminuiu a viabilidade celular com o aumento da concentração.

Após 48 horas de incubação, o EAC e o EEC provocaram uma variação na viabilidade celular de 47,5% a 102,5%, e de 38,1% a 118,9%, respetivamente (Figura 12-B). Ambos os extratos de cereja variedade "Lapins" mostraram uma diminuição da viabilidade celular à medida que a concentração aumentava.

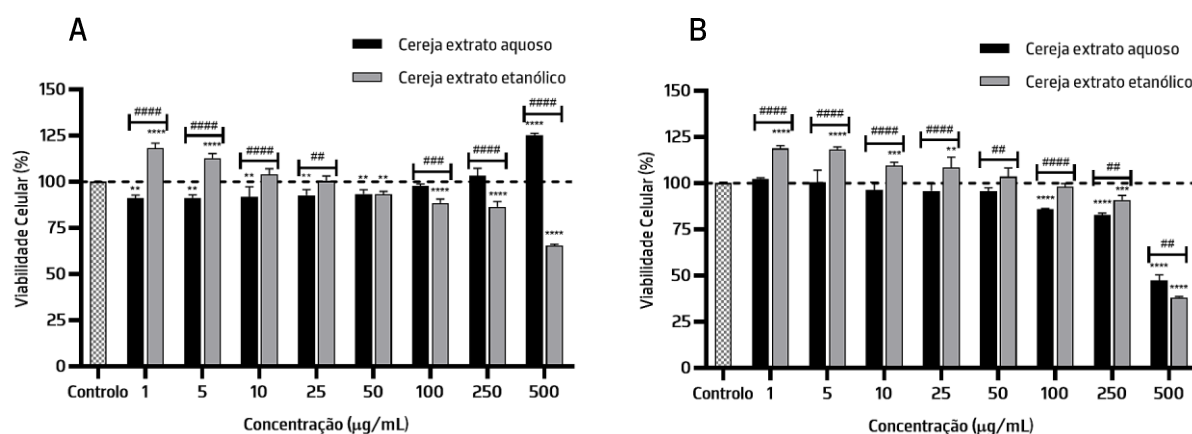


Figura 12. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações do extrato aquoso e etanólico (70% (V/V)) de cereja variedade "Lapins", após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três amostras independentes ($n=3$), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

Desta forma, durante a incubação de 24 horas, o EAC reduziu significativamente a viabilidade celular em concentrações até 50 µg/mL em comparação com o controlo ($p < 0,01$), enquanto na maior concentração testada (500 µg/mL), o EAC aumentou significativamente a viabilidade celular ($p < 0,0001$). Por outro lado, o EEC aumentou significativamente a viabilidade celular em concentrações até 5 µg/mL em comparação com o controlo ($p < 0,0001$), mas a partir de 50

$\mu\text{g}/\text{mL}$ provocou uma redução significativa na viabilidade celular ($p < 0,0001$). No entanto, a citotoxicidade foi observada apenas na concentração de $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, possuindo uma viabilidade celular de 65,4% (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Na incubação durante 48 horas, o EAC diminuiu significativamente a viabilidade celular em comparação com o controlo a partir da concentração de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), enquanto o EEC aumentou significativamente a viabilidade celular até à concentração de $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$), e diminuiu a viabilidade também de forma significativa a partir da concentração de $250 \mu\text{g}/\text{mL}$, sendo essa diminuição mais acentuada do que no EAC ($p < 0,0001$). No entanto, em ambas os extratos, foi observada citotoxicidade apenas na concentração de $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Denota-se que, ao comparar duas concentrações semelhantes, a viabilidade celular induzida pelo EEC tende a ser significativamente maior do que a provocada pelo EAC ($p < 0,01$), exceto após 24 horas de incubação, quando o EAC resulta numa viabilidade celular significativamente superior ao EEC ($p < 0,001$). Além disso, após 48 horas de incubação, na concentração de $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ o EAC demonstrou ter uma citotoxicidade significativamente menor do que o EEC ($p < 0,01$) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Os resultados apresentados permitiram apurar que os extratos de cereja variedade “Lapins” possuem potencial para aumentar a viabilidade celular e apresentam toxicidade nas células HepG2 apenas na concentração mais alta analisada, ou seja, $500 \mu\text{g}/\text{mL}$.

4.6. Análise Química da Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade “Lapins”

Tal como referido anteriormente (ponto 4.5.), a cerveja artesanal IS-N (estilo Imperial Stout) foi a cerveja artesanal selecionada para incorporação do EAC e EEC. A incorporação de ingredientes na cerveja após o seu acondicionamento na garrafa final, permite que os consumidores participem no processo de personalização da cerveja. No entanto, requer cuidados assépticos rigorosos para evitar contaminações primárias (provenientes de matérias-primas e equipamentos de produção) e contaminações secundárias (adicionadas durante o acondicionamento) (Paiva et al., 2021). A tabela 11 apresenta os valores de pH, acidez total e TAR da cerveja (IS-N) e das cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins”.

Tabela 11. Análise química (pH, acidez total e teor de açúcares redutores) da cerveja controlo (IS-N) e das cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins” (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).

Amostra de Cerveja	pH	Acidez Total (% de ácido láctico)	Teor de Açúcares Redutores (mg GE/L)
IS-N	4,60 ± 0,00 ^{b,c}	0,26 ± 0,00 ^{b,c}	16480,00 ± 156,62 ^{b,c}
IS-N + EAC	4,43 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,01 ^a	15392,50 ± 75,00 ^a
IS-N + EEC	4,42 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	15136,25 ± 231,25 ^a

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. EAC: Extrato Aquoso de Cereja Variedade “Lapins”; EEC: Extrato Etanólico de Cereja Variedade “Lapins”; GE: Equivalentes de Glicose; ^a Significativamente diferente quando comparado com IS-N ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EAC ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EEC ($p < 0,05$).

No presente trabalho a adição de EAC e EEC resultou numa diminuição significativa do valor de pH em comparação à cerveja original (4,60 ± 0,00 na cerveja IS-N, face a 4,42 ± 0,00 na combinação IS-N + EEC e 4,43 ± 0,00 na combinação IS-N + EAC ($p < 0,05$), e no aumento significativo da acidez total ($p < 0,05$).

O estudo de Nardini e Garaguso (2020) corrobora os resultados do presente trabalho, uma vez que as cervejas com adição de diferentes variedades de *P. avium* L., ou seja, variedade “Griotta” (cerveja 1, 300 g/L), variedades “Corniolo”, “Ravenna” e “Graffione” (cerveja 2, 200 g/L), durante a primeira etapa do processo de fermentação, possuíam um menor valor de pH, 3,71 e 3,86, respetivamente, face às cervejas industriais do tipo Ale, nas quais o valor de pH variou entre 4,39–4,73. Além disso, testaram a adição de *Rubus idaeus* L. (framboesas), *Prunus persica* L. (pêssegos), *Prunus armeniaca* L. (damascos), *Vitis vinífera* L. (uvas), *Prunus domestica* L. (ameixas), *Citrus sinensis* L. (casca de laranja) e *Malus domestica* L. (maçãs) verificando que o pH destas cervejas foi inferior ao das cervejas industriais Ale, à exceção das cervejas com adição de casca de laranja e maçã que possuíam um pH de 4,86 e 4,42, respetivamente (Nardini & Garaguso, 2020).

Por sua vez, Okechukwu et al. (2022) avaliaram a incorporação de pó de *C. vulgaris* na cerveja (3,3 g/L, 5 g/L e 10 g/L), após sete dias de fermentação, não tendo sido verificadas diferenças significativas de pH e de acidez titulável entre as cervejas com adição de *C. vulgaris* e a cerveja do estilo Pilsner da Alemanha (cerveja controlo).

Em geral, os valores de pH e acidez total da cerveja estão relacionados. Na cerveja comercial, um pH mais baixo significa uma acidez total mais elevada, sendo mais evidente na cerveja contendo frutos (Adadi et al., 2017; Santos et al., 2022). Os frutos podem trazer mais açúcar fermentável para a levedura. Quando a levedura fermenta, produz ácidos orgânicos, o que leva a um aumento da acidez total (Ocloo & Ayernor, 2008).

Desta forma, a diminuição significativa do pH e aumento significativo da acidez total ($p < 0,05$) no presente trabalho pode dever-se ao pH da cereja variedade "Lapins" e à produção de ácidos orgânicos aquando da adição dos extratos de cereja à cerveja engarrafada (Cho et al., 2018). Um pH mais baixo pode melhorar/suavizar o sabor da cerveja. Além disso, um ambiente ácido pode inibir o crescimento de microrganismos de deterioração, tendo um impacto positivo na vida útil da cerveja (Martínez et al., 2017). Geralmente, o pH da cerveja comercial comum está entre 4,0 e 5,5 (Li & Liu, 2015). Quanto à cerveja contendo frutos, verifica-se que o pH é de cerca de 3,8–4,4 (X. Zhao et al., 2023). Por sua vez, o pH da cereja variedade "Lapins", no estudo de Vavoura et al. (2015), revelou ser de $3,96 \pm 0,01$.

Além disso, alterações significativas no parâmetro de pH e acidez total, podem provocar alterações nas características organolépticas, na estabilidade biológica e química da cerveja, uma vez que valores mais baixos de pH podem resultar numa maior oxidação de isohumulonas e menor estabilidade de sabor durante o armazenamento (Pai et al., 2015; Paiva et al., 2021).

Além disso, o TAR diminuiu significativamente com a incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins" ($p < 0,05$). Tal resultado não era esperado, uma vez que a cereja-doce esteve em contacto com a cerveja durante 24 horas a 8 °C, temperatura que não se enquadra nas temperaturas em que *S. cerevisiae* fermenta mais eficazmente os açúcares redutores (15 °C a 25 °C) (Breda et al., 2022). Além disso, as cerejas possuem aproximadamente 13 g/100 g de açúcares simples (como glicose e frutose) o que resultaria no aumento do TAR na cerveja final (Nedyalkov et al., 2023). Porém, esses açúcares podem ter sido fermentados, em parte, pelas leveduras, mesmo estas não possuindo a temperatura ótima de fermentação, ou por eventuais microrganismos contaminantes presentes nos extratos de cereja variedade "Lapins" (Paiva et al., 2021).

4.7. Determinação do TPC na Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade “Lapins”

Os resultados do ensaio TPC após incorporação dos extratos de cereja variedade “Lapins” estão presentes na tabela 12.

Tabela 12. Resultados do ensaio de determinação do teor de fenólicos totais (TPC) para a cerveja controlo (IS-N) e para as cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins” (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).

Amostra de Cerveja	TPC (mg GAE/g)
IS-N	8,3 ± 0,2 ^c
IS-N + EAC	8,4 ± 0,1 ^c
IS-N + EEC	4,2 ± 0,1 ^{a,b}

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. TPC: Teor de Fenólicos Totais; GAE: Equivalentes de Ácido Gálico; EAC: Extrato Aquoso de Cereja Variedade “Lapins”; EEC: Extrato Etanólico de Cereja Variedade “Lapins”; ^a Significativamente diferente quando comparado com IS-N ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EAC ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EEC ($p < 0,05$).

Pela análise dos resultados verifica-se que a adição do EEC à cerveja IS-N (estilo Imperial Stout), reduziu significativamente o valor de TPC da cerveja original ($p < 0,05$), passando de 8,3 ± 0,2 mg GAE/g para 4,2 ± 0,1 mg GAE/g, respetivamente. Por sua vez, a adição do EAC não despoletou diferenças significativas no valor de TPC. Tais resultados não eram expectáveis, uma vez que o EEC isolado possuía um valor de TPC significativamente superior ao EAC ($p < 0,05$).

Os resultados do presente trabalho não vão de encontro aos obtidos por Nardini e Garaguso (2020), uma vez que na cerveja com adição de *P. avium* variedade “Griotta” (300 g/L) obtiveram o valor de TPC de 767 ± 13 mg GAE/L e na cerveja com adição das variedades “Corniolo”, “Ravenna” e “Graffione” (200 g/L) o valor de TPC foi de 747 ± 8 mg GAE/L. Em comparação, as cervejas industriais do tipo Ale possuíam TPC entre 383 ± 7 mg GAE/L e 482 ± 10 mg GAE/L, sendo estes valores inferiores aos obtidos nas cervejas com cereja-doce (Nardini & Garaguso, 2020). Além disso, Nardini e Garaguso (2020) recorreram à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de arranjo de díodos (HPLC-DAD) para analisar os compostos fenólicos presentes nas cervejas convencionais do tipo Ale e nas cervejas com a adição das

diferentes variedades de *P. avium*. As cervejas convencionais revelaram possuir ácido vanílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico. A adição da variedade de cereja "Griotta" na cerveja tipo Ale aumentou a concentração desses ácidos e adicionou ácido clorogénico, neoclorogénico, flavonoides e resveratrol. Já as cervejas com as variedades de cereja-doce "Corniolo", "Ravenna" e "Graffione" têm uma composição fenólica semelhante à variedade "Griotta", mas apresentam apenas traços de ácido siríngico e resveratrol (Nardini & Garaguso, 2020). Desta forma, verifica-se que a adição de *P. avium* pode enriquecer a bebida com compostos fenólicos.

No estudo de Nedyalkov et al. (2023) a adição de suco e bagaço de cereja-doce nas mesmas concentrações (15% (m/V)), em diferentes momentos da fermentação, resultou num aumento do TPC em comparação com o controlo. O suco proporcionou um incremento de 9 a 11%, enquanto o bagaço gerou um aumento entre 20 e 25% (Nedyalkov et al., 2023).

No estudo de Ducruet et al. (2017) avaliaram a adição de bagas de goji (50 g/L) em diferentes etapas do processo de produção de cerveja. A adição de bagas de goji inteiras no início da fervura revelou o maior valor de TPC (623 ± 16 mg GAE/L), enquanto a adição de baga moída na garrafa apresentou o menor valor (357 ± 14 mg GAE/L). A cerveja controlo, estilo Amber Ale, teve um TPC significativamente inferior (355 ± 11 mg GAE/L) em comparação com as cervejas com cereja-doce ($p < 0,05$). A análise fenólica mostrou que o controlo Amber Ale continha ácido *p*-cumárico e ferúlico, e a adição de goji resultou no aparecimento de rutina e análogos do ácido ascórbico, exceto quando adicionados no início da fermentação primária ou antes da secundária, fases em que a rutina não foi detetada (Ducruet et al., 2017).

Wu et al. (2024) investigaram o impacto da adição de chá-verde (3 g/L) na composição fenólica da cerveja em quatro momentos distintos do processo de produção (início e final da fervura, arrefecimento e fermentação). Verificaram que as cervejas possuíam ácido ferúlico, epicatequina, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, catequina, ácido cafeico, rutina, ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecuíco e ácido clorogénico, porém as cervejas com chá-verde possuíam um valor total de compostos fenólicos significativamente superior ao da cerveja controlo ($p < 0,05$) (Wu et al., 2024).

Deng et al. (2020) verificaram que a adição do fruto *Schisandra chinensis* (omija) (2 g/L) em diferentes etapas de produção de cerveja, nomeadamente, no início da fervura do mosto, antes da fermentação e antes do acondicionamento em garrafa, permitiu aumentar o valor de TPC em comparação à cerveja controlo do tipo Ale, $606,82 \pm 16,64$ mg GAE/L, $575,00 \pm 12,45$ mg GAE/L

e $568,73 \pm 13,57$ mg GAE/L vs. $519,09 \pm 15,78$ mg GAE/L, respectivamente. Estes resultados corroboram que a adição de um ingrediente na etapa de fervura do mosto permitiu o maior aumento de TPC na cerveja final, no entanto a adição do fruto no produto final (antes do acondicionamento em garrafa) também permitiu um aumento significativo do valor de TPC em comparação à cerveja controlo ($p < 0,05$) (Deng et al., 2020).

No estudo de Ulloa et al. (2017) analisaram a incorporação do extrato etanólico de própolis (0,05, 0,15 e 0,25 g/L) na etapa de maturação da cerveja do estilo Golden Ale. Os resultados permitiram apurar que a adição de própolis nesta etapa de produção de cerveja aumenta o TPC (Ulloa et al., 2017).

4.8. Determinação da Atividade Antioxidante da Cerveja Artesanal Após Incorporação de Cereja Variedade “Lapins”

No presente trabalho, embora tenham sido realizados ensaios de capacidade antioxidante tanto na cerveja IS-N (estilo Imperial Stout) quanto nos extratos de cereja variedade “Lapins” de forma isolada, é crucial realizar esses mesmos ensaios após a incorporação dos extratos de cereja variedade “Lapins” na cerveja, dado que a interação entre os componentes da cerveja e os compostos dos extratos de cereja podem alterar o perfil antioxidante final da bebida. Estes resultados estão presentes na tabela 13.

No ensaio ABTS a adição do EAC e do EEC à cerveja IS-N aumentou significativamente a capacidade de neutralização dos radicais $ABTS^{\cdot+}$ ($p < 0,05$). A cerveja IS-N + EAC revelou ter um valor de IC_{50} de $60,5 \pm 1,5$ $\mu\text{g/mL}$, apresentando, desta forma, uma moderada capacidade antioxidante com este ensaio ($50 < IC_{50} < 100$ $\mu\text{g/mL}$), enquanto a cerveja IS-N + EEC revelou ter um valor de IC_{50} de $48,0 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$, indicando uma elevada capacidade antioxidante ($IC_{50} < 50$ $\mu\text{g/mL}$). Por sua vez, a cerveja IS-N original embora se enquadre na capacidade antioxidante moderada ($50 < IC_{50} < 100$) possui pior capacidade antioxidante ($IC_{50} = 80,1 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$) (Kuetze & Efferth, 2010).

O estudo de Nardini e Garaguso (2020) corrobora que a adição de cereja-doce à cerveja aumenta a capacidade antioxidante da cerveja final. Desta forma, a cerveja com a variedade “Griotta” (300 g/L) obteve o valor de $3,53 \pm 0,06$ mM TE/L sendo este superior ao obtido na cerveja com as variedades “Corniolo”, “Ravenna” e “Graffione” (200 g/L), $3,41 \pm 0,10$ mM TE/L. Ambas as cervejas com adição de cereja-doce revelaram ser superiores às cervejas industriais

do tipo Ale nas quais o valor de ABTS variou entre $1,55 \pm 0,02$ mM TE/L e $2,03 \pm 0,04$ mM TE/L (Nardini & Garaguso, 2020).

Por sua vez, Ducruet et al. (2017) apuraram que a adição de bagas de goji (50 g/L) à cerveja aumentou significativamente os valores obtidos no ensaio ABTS ($p < 0,05$).

Tabela 13. Resultados dos ensaios ABTS, H₂O₂, FRAP e ferrozina da cerveja controlo (IS-N) e das cervejas após adição dos extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins” (IS-N + EAC e IS-N + EEC, respetivamente).

Amostra de Cerveja	ABTS (IC ₅₀)*	H ₂ O ₂ (IC ₅₀)**	FRAP (μmol TE/g)	Ferrozina (IC ₅₀ ***)
IS-N	80,1 ± 1,1 ^{b,c}	27,0 ± 1,5 ^{b,c}	44,4 ± 0,0 ^{b,c}	
IS-N + EAC	60,5 ± 1,5 ^{a,c}	78,8 ± 1,6 ^{a,c}	42,7 ± 0,0 ^{a,c}	Sem IC ₅₀
IS-N + EEC	48,0 ± 0,6 ^{a,b}	58,7 ± 0,4 ^{a,b}	39,7 ± 0,0 ^{a,b}	

Os resultados numéricos correspondem a valores médios ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. TE: Equivalentes de Trolox; EAC: Extrato Aquoso de Cereja Variedade “Lapins”; EEC: Extrato Etanólico de Cereja Variedade “Lapins”; *, ** e ***: Concentração expressa em μg/mL necessária para redução de 50% do radical ABTS^{•+}, das moléculas de H₂O₂, e dos iões de Fe²⁺, respetivamente; ^a Significativamente diferente quando comparado com IS-N ($p < 0,05$); ^b Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EAC ($p < 0,05$); ^c Significativamente diferente quando comparado com IS-N + EEC ($p < 0,05$).

No estudo de Chen et al. (2022) a adição de *Dendrobium officinale* (100 g/L) no momento de fervura do mosto também revelou possuir um aumento significativo de capacidade antioxidante face ao controlo ($p < 0,05$), tendo sido obtido o valor de 2,62 μg ácido ascórbico/mL e 1,91 μg ácido ascórbico/mL, respetivamente.

A adição do extrato etanólico de própolis (0,05, 0,15 e 0,25 g/L), no estudo de Ulloa et al. (2017), durante a maturação, também revelou aumentar a capacidade de neutralização do radical ABTS^{•+}, tendo sido obtidos os valores entre $0,687 \pm 0,094$ mmol TE/L (própolis 0,15 g/L) e $0,808 \pm 0,197$ mmol TE/L (própolis 0,25 g/L), face ao valor de $0,629 \pm 0,038$ mmol TE/L da cerveja do estilo Golden Ale (controlo).

Por sua vez, no ensaio H₂O₂ a adição do EAC e do EEC à cerveja IS-N diminuiu significativamente a capacidade antioxidante da cerveja final ($p < 0,05$), dado que a cerveja IS-N revelou ter um IC₅₀ de $27,0 \pm 1,5$ μg/mL, apresentando, desta forma, elevada capacidade

antioxidante ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), enquanto as cervejas IS-N + EAC e IS-N + EEC revelaram possuir um valor de IC_{50} de $78,8 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ e $58,7 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$, respetivamente, indicando capacidade antioxidante moderada ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) (Kuetze & Efferth, 2010). De salientar que a cerveja IS-N + EEC revelou possuir atividade antioxidante significativamente superior à cerveja IS-N + EAC ($p < 0,05$).

No estudo de Okechukwu et al. (2022) a adição de *C. vulgaris* (3,3, 5 e 10 g/L) à cerveja do estilo Pilsner da Alemanha revelou aumentar a capacidade de neutralização das moléculas de H_2O_2 , tendo o valor do ensaio H_2O_2 variado entre $88,86 \pm 0,15\%$ e $89,98 \pm 0,04\%$, enquanto o valor da cerveja controlo (estilo Pilsner da Alemanha) foi de $88,86 \pm 0,13\%$.

No ensaio da ferrozina, à semelhança dos resultados da cerveja IS-N e dos extratos de cereja-doce isolados, não foi possível determinar o valor de IC_{50} de IS-N + EAC e IS-N + EEC na gama de concentrações testadas (1-1000 $\mu\text{g/mL}$), o que revelou uma baixa capacidade antioxidante ($IC_{50} > 100$) (Kuetze & Efferth, 2010).

O estudo de L. Yang et al. (2023) revelou a possibilidade de aumentar a capacidade de redução de iões Fe^{2+} pela adição de diferentes chás verde (2 g/L) à cerveja artesanal tipo Lager na etapa de fervura do mosto. Desta forma, as cervejas com adição de chá verde possuíram um valor no ensaio da ferrozina entre $0,96 \pm 0,05 \mu\text{mol EDTAE/L}$ (*Biluochun*) e $1,31 \pm 0,04 \mu\text{mol EDTAE/L}$ (*Xihu Longjing*), enquanto o controlo possuiu um valor de $0,90 \pm 0,03 \mu\text{mol EDTAE/L}$ (L. Yang et al., 2023).

Assim sendo, até onde se tem conhecimento, não existe literatura que ateste a capacidade antioxidante da cerveja após incorporação de *P. avium* L., pelo ensaio H_2O_2 e pelo ensaio da ferrozina. No entanto, verifica-se a existência de literatura que estuda ingredientes que contribuíram para o aumento da capacidade antioxidante por esses dois mecanismos de ação (Okechukwu et al., 2022; L. Yang et al., 2023).

No ensaio do FRAP a cerveja IS-N + EAC revelou possuir capacidade antioxidante significativamente superior à cerveja IS-N + EEC ($p < 0,05$), porém ambas possuem capacidade antioxidante significativamente inferior à cerveja IS-N ($p < 0,05$). Estes resultados não são concordantes com o artigo de Nardini e Garaguso (2020) no qual a adição de *P. avium* L. aumentou a capacidade antioxidante pelo ensaio do FRAP. A cerveja com a variedade "Griotta" (300 g/L) possuía um valor do ensaio FRAP de $9,76 \pm 0,11 \text{ mM Fe}_2\text{SO}_4 /\text{L}$, enquanto a cerveja com as variedades "Corniolo", "Ravenna" e "Graffione" (200 g/L) possuía o valor de $8,55 \pm 0,04 \text{ mM Fe}_2\text{SO}_4 /\text{L}$. Em contrapartida, os valores do ensaio FRAP nas cervejas industriais do tipo Ale

(controlo) variaram de $3,38 \pm 0,04$ mM Fe_2SO_4 /L a $4,39 \pm 0,18$ mM Fe_2SO_4 /L (Nardini & Garaguso, 2020).

No estudo de Ulloa et al. (2017) a adição de própolis (0,05, 0,15 e 0,25 g/L) à cerveja revelou aumentar a capacidade antioxidante da cerveja final, pelo que o valor do ensaio FRAP variou entre $1555,0 \pm 175,4$ $\mu\text{mol TE/L}$ (própolis 0,05 g/L) e $1892,5 \pm 251,0$ $\mu\text{mol TE/L}$ (própolis 0,25 g/L), enquanto o valor da cerveja do estilo Golden Ale (controlo) foi de $1415,0 \pm 241,8$ $\mu\text{mol TE/L}$.

Djordjevic et al. (2016) apuraram que a adição de 5 plantas, nomeadamente *Melissae folium* (folhas de erva-cidreira), *Thymi herba* (erva de tomilho), *Juniperi fructus* (frutos de zimbro), *Urticae radix* (raiz de urtiga) e *Lupuli strobuli* (cones de lúpulo), à cerveja do estilo Pilsner, aumentou a capacidade de redução de iões Fe^{3+} . Desta forma, os valores do ensaio FRAP variaram entre $4,25 \pm 0,04$ mM TE/L (raiz de urtiga) e $4,71 \pm 0,08$ mM TE/L (erva de tomilho) para as cervejas com adição de plantas, enquanto no controlo (cerveja Pilsner) foi de $4,15 \pm 0,02$ mM TE/L (Djordjevic et al., 2016). No estudo de Nardini e Foddai (2020) os valores de FRAP também foram superiores nas cervejas com adição de ingredientes. Os valores do ensaio FRAP variaram de $3,6 \pm 0,05$ $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{L}$ (chá verde) – $10,2 \pm 0,02$ mM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{L}$ (nozes), enquanto as cervejas convencionais possuíam valores do ensaio FRAP entre $1,7 \pm 0,02$ mM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{L}$ (tipo Lager) – $3,9 \pm 0,01$ mM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{L}$ (tipo Ale) (Nardini & Foddai, 2020).

Em suma, a incorporação de EAC e EEC à garrafa de cerveja IS-N não demonstrou ser promissora no que concerne à melhoria das capacidades antioxidantes, dado que apenas se observou um aumento da capacidade antioxidante no ensaio ABTS, enquanto nos demais ensaios antioxidantes, nomeadamente H_2O_2 e FRAP, houve uma diminuição significativa da capacidade antioxidante com a adição dos extratos de cereja variedade “Lapins”.

4.9. Toxicidade Hepática da Cerveja Após Incorporação dos Extratos de Cereja Variedade “Lapins”

Durante a incubação de 24 horas, a viabilidade celular da cerveja IS-N (estilo Imperial Stout) em solvente aquoso + EEC variou entre 96,7% e 127,3%, apresentando um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao controlo a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) (Figura 13-A). Em contrapartida, a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC revelou possuir uma viabilidade celular entre 67,4% e 105,1%, demonstrando citotoxicidade até à concentração

de 5 µg/mL, e diminuição da viabilidade celular de forma significativa até à concentração de 50 µg/mL ($p < 0,01$) (Figura 13-A) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

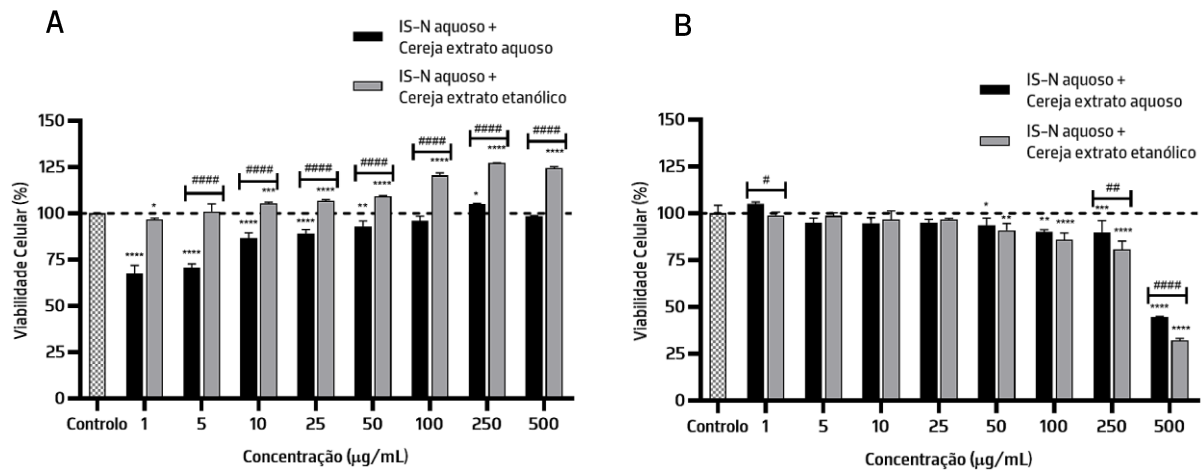


Figura 13. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade “Lapins”, e cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato etanólico de cereja variedade “Lapins” (70 % (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

Por sua vez, na incubação de 48 horas, a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC e a cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC apresentaram viabilidade celular que variou de 44,5% a 105,0%, e de 32,2% a 98,9%, respetivamente (Figura 13-B). Nenhuma das cervejas em solvente aquoso com adição de extrato de cereja aumentou a viabilidade celular de forma significativa em relação ao controlo. A partir da concentração de 50 µg/mL, houve uma diminuição da viabilidade celular, sendo esta diminuição significativa ($p < 0,05$) para células incubadas com IS-N em solvente aquoso + EAC, e ainda mais pronunciada ($p < 0,01$) para células incubadas com IS-N em solvente aquoso + EEC. No entanto, em ambas as amostras, apenas se verificou citotoxicidade na concentração de 500 µg/mL (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Na incubação durante 24 horas, a viabilidade celular da cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC variou de 104,0% e 120,8%, enquanto na cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC variou de 98,5% a 175,0% (Figura 14-A). A cerveja IS-N em solvente etanólico com adição dos extratos de cereja variedade “Lapins” não apresentou citotoxicidade durante a incubação de 24 horas, Figura 14-A (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Observou-se um aumento significativo da

viabilidade celular em comparação ao controlo a partir da concentração de 10 µg/mL na cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC ($p < 0,05$) e a partir da concentração de 25 µg/mL na cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC ($p < 0,01$).

Após 48 horas de incubação, a viabilidade celular da cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC variou de 47,3% a 122,1%, demonstrando um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao controlo até à concentração de 50 µg/mL ($p < 0,05$) e apresentando diminuição da viabilidade celular significativa a partir de 250 µg/mL ($p < 0,05$), Figura 14-B. Na cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC, a viabilidade celular variou de 31,7% a 101,7%, revelando diminuição da viabilidade celular de forma significativa em comparação ao controlo a partir da concentração de 100 µg/mL ($p < 0,05$). No entanto, em ambas as amostras, apenas se verificou citotoxicidade na concentração de 500 µg/mL (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Em suma, a cerveja IS-N em solvente etanólico com adição de extratos de cereja destaca-se pela maior capacidade de aumentar a viabilidade celular durante as incubações de 24 horas e 48 horas (Figuras 13 e 14). No entanto, ambas as cervejas mostraram ser promissoras, dado só apresentarem citotoxicidade na concentração mais alta após 48 horas de incubação, exceto a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC, que demonstrou citotoxicidade até à concentração de 5 µg/mL, após 24 horas de incubação (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

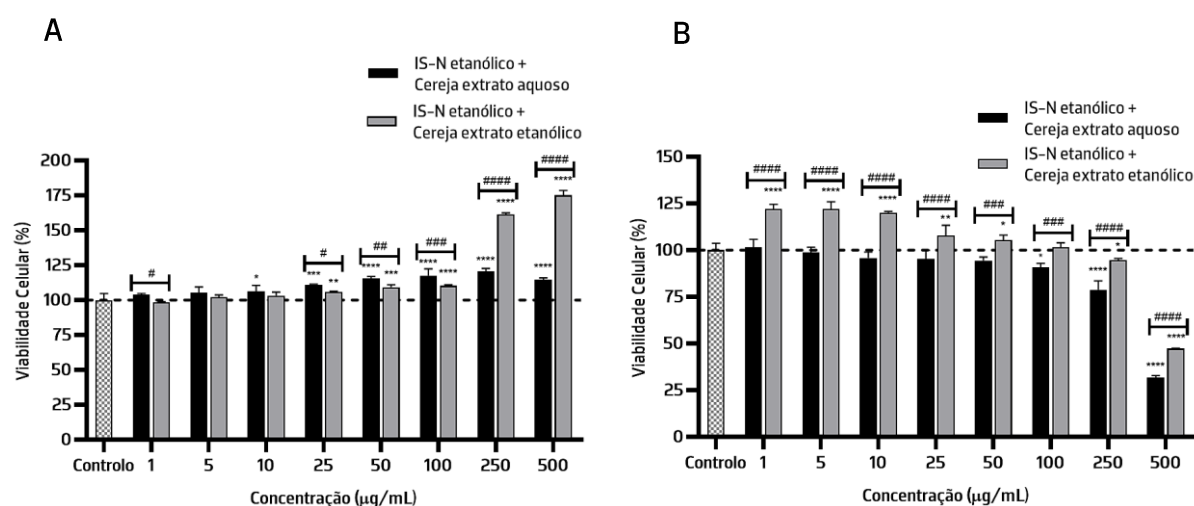


Figura 14. Citotoxicidade, determinada pelo ensaio MTT, de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5% (V/V)) + Extrato etanólico de cereja variedade “Lapins” (70 % (V/V)), após 24 horas (A) e 48 horas (B), em células HepG2. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controlo (células sem extrato). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

4.10. Avaliação da Proteção Contra Danos Causados pelo *tert*-butil hidroperóxido

O fígado é muito suscetível ao stresse oxidativo causado pelo consumo de bebidas alcoólicas, uma vez que é neste órgão que ocorre a principal metabolização do álcool (Hyun et al., 2021). Portanto, tem-se dado atenção à proteção do fígado, especialmente através do consumo de antioxidantes (Hyun et al., 2021). Tanto a cerveja quanto a cereja são conhecidas pela presença de compostos com elevada capacidade antioxidante, em particular os compostos fenólicos. Assim, um dos objetivos do presente trabalho consistiu em avaliar os potenciais efeitos protetores e antioxidantes de diferentes amostras, nomeadamente, a cerveja IS-N (estilo Imperial Stout) antes e após incorporação dos extratos de cereja variedade “Lapins” e os extratos aquoso e etanólico de cereja variedade “Lapins”. A avaliação foi realizada em células HepG2, utilizando dois regimes de incubação, ou seja, pré-incubação e co-incubação, para analisar a proteção contra o dano causado pelo tóxico *t*-BOOH.

No regime de pré-incubação as células foram incubadas com as amostras em análise, seguindo-se um período de recuperação em meio fresco antes da adição do tóxico *t*-BOOH, para permitir que as células desenvolvessem defesas antioxidantes endógenas. Desta forma, o ensaio de pré-incubação possibilita a avaliação da capacidade das amostras em estudo de prevenir ou proteger contra o stress oxidativo (Carvalho et al., 2014). Por sua vez, o regime de co-incubação com as amostras e o tóxico *t*-BOOH possibilita a avaliação do efeito antioxidante direto dos extratos sobre os mediadores tóxicos do *t*-BOOH (Carvalho et al., 2014).

O *t*-BOOH é um indutor exógeno de stresse oxidativo, comumente utilizado em ensaios *in vitro* para verificar a capacidade protetora de um determinado composto ativo contra os danos induzidos por um tóxico (Kučera et al., 2014; Lima et al., 2006). O mecanismo de ação exato do *t*-BOOH não é bem conhecido, contudo um dos mecanismos baseia-se na metabolização deste composto pelas células, o que resulta na formação de radicais livres, nomeadamente, peróxil e alcóxil, podendo despoletar o início da peroxidação lipídica e diminuir os níveis de glutathiona reduzida (GSH), o que pode culminar na alteração da homeostase do cálcio, alteração do potencial da membrana mitocondrial e eventualmente causar a morte celular (Kučera et al., 2014; Lazze, 2003; Lima et al., 2006).

Uma vez que a resposta celular ao *t*-BOOH depende das condições de cultura, estudou-se primeiro a resposta das células HepG2 à concentração de *t*-BOOH (1 mM, 2,5 mM, 4 mM) e ao tempo de incubação (1, 2 e 3 horas). Desta forma, nos tempos de contacto estudados, a viabilidade celular na concentração de 1 mM foi de 110,7%, 80,8% e 58,2%, na concentração de

2,5 mM foi de 98,4%, 67,3% e 50,3% e na concentração de 4 mM foi de 95,6%, 60,5% e 43,1%, respetivamente (Figura 15).

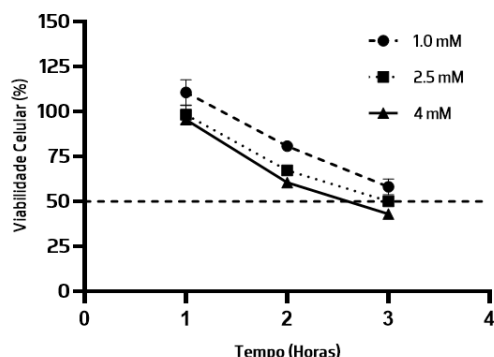


Figura 15. Atividade metabólica do *tert*-butil hidroperóxido em diferentes concentrações em células HepG2.

Desta forma, a concentração de 2,5 mM com tempo de contacto de 3 horas revelou ser a mais adequada, pois foi observada uma diminuição na viabilidade celular de aproximadamente 50%, (Figura 15).

No ensaio de pré-incubação utilizou-se como controlo-positivo a curcumina, um antioxidante natural. Por sua vez, no ensaio de co-incubação utilizou-se como controlo-positivo a quercetina, uma vez que no estudo de Lima et al. (2006), realizado em células HepG2 em regime de co-incubação, este composto fenólico revelou possuir a capacidade de prevenir a depleção da GSH e de diminuir significativamente a peroxidação lipídica e os danos ao ADN, o que se traduz numa diminuição significativa da morte celular induzida por *t*-BOOH ($p < 0,05$).

A Figura 16 mostra que a incubação das cervejas IS-N em solvente aquoso e solvente etanólico, no regime de pré e co-incubação, resultou, genericamente, em proteção contra o dano causado pelo tóxico *t*-BOOH.

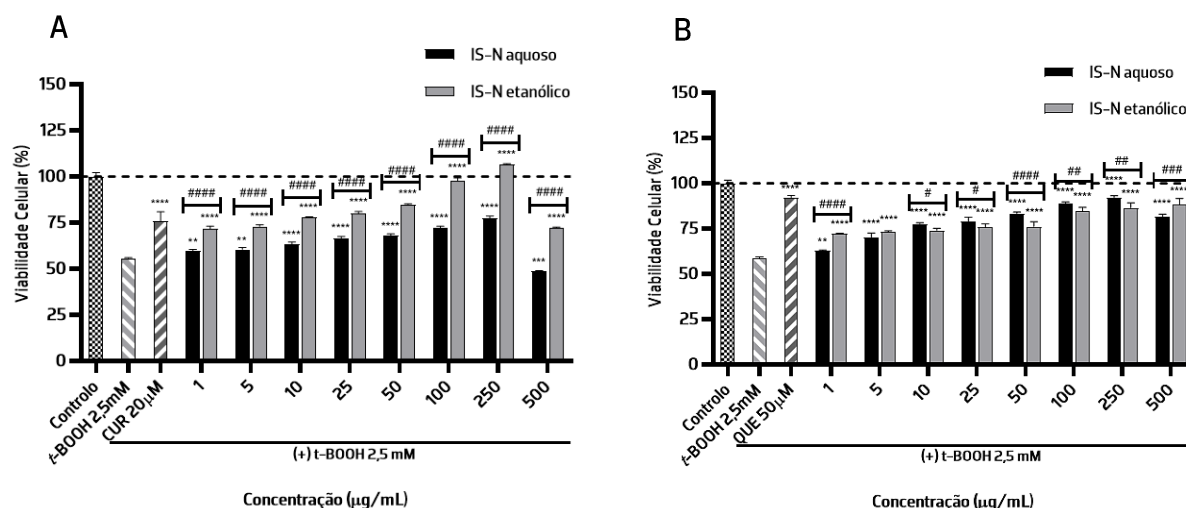


Figura 16. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação (A) e co-incubação (B), de diferentes concentrações de cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico (8,5% (V/V)), em células HepG2. CUR 20 µM: Curcumina 20 µM; QUE 50 µM: Quercetina 50 µM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o t-BOOH; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

No ensaio de pré-incubação a cerveja IS-N em solvente aquoso possuiu viabilidade celular que variou entre 48,8% e 77,4% (Figura 16-A), sendo significativamente superior ao tóxico até à concentração de 250 µg/mL ($p < 0,01$). Porém apresentou citotoxicidade em comparação ao controlo, uma vez que a viabilidade celular é inferior a 80% (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Por outro lado, a cerveja IS-N em solvente etanólico demonstrou uma viabilidade celular entre 71,6% e 106,5%, sendo significativamente superior ao tóxico em todas as concentrações analisadas ($p < 0,0001$). Contudo, apenas nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 250 µg/mL não apresentou citotoxicidade (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Desta forma, verifica-se que quando comparadas duas concentrações semelhantes, a cerveja IS-N em solvente etanólico foi significativamente mais eficaz na proteção das células contra o stress oxidativo do que a cerveja IS-N em solvente aquoso ($p < 0,0001$).

No ensaio de co-incubação a cerveja IS-N em solvente aquoso demonstrou uma viabilidade celular entre 63,0% e 91,9%, enquanto em solvente etanólico variou de 72,4% a 88,2%. A cerveja IS-N, em ambos os solventes, revelou ter a capacidade de aumentar a viabilidade celular de forma significativa em relação ao tóxico em todas as concentrações analisadas ($p < 0,01$). No entanto, a

cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico deixaram de ser citotóxicas somente a partir da concentração de 50 µg/mL e 100 µg/mL, respetivamente.

Assim sendo, constata-se que a proteção das cervejas IS-N em solvente aquoso e etanólico foi mais pronunciada no regime de co-incubação. Tais resultados eram expectáveis, uma vez que a cerveja IS-N revelou possuir moderada e elevada capacidade de neutralizar radicais livres, ABTS e H₂O₂, respetivamente. Além disso, revelou possuir boa capacidade de neutralizar iões metálicos, nomeadamente o Fe³⁺, intervindo na formação de mais radicais livres.

Os regimes de pré e co-incubação com EAC e EEC também resultou em proteção contra o stress oxidativo induzido pelo tóxico *t*-BOOH (Figura 17).

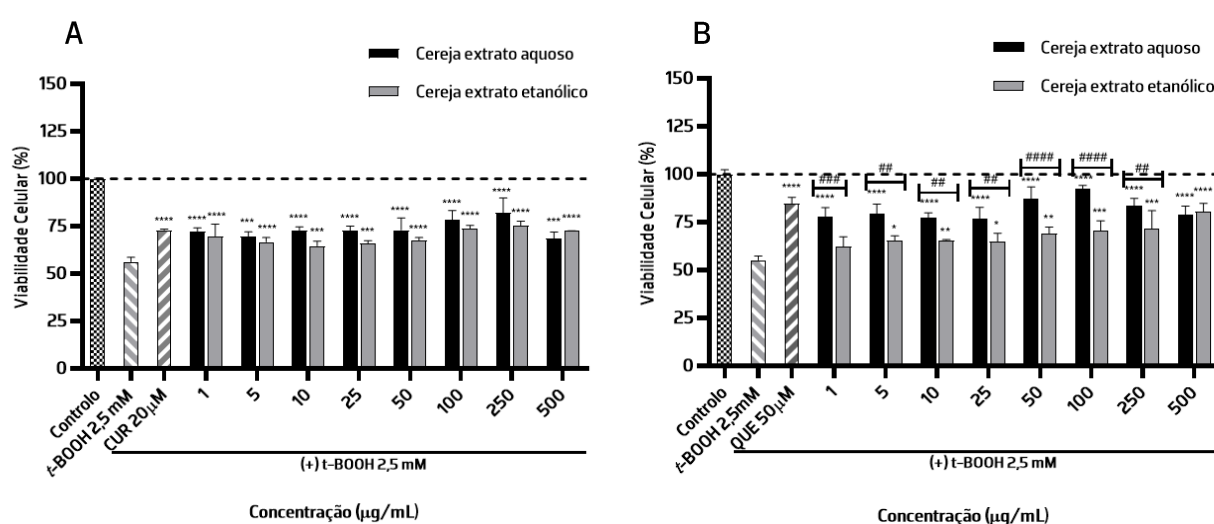


Figura 17. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação (A) e co-incubação (B), de diferentes concentrações do extrato aquoso e etanólico (70% (V/V)) de cereja variedade “Lapins”, em células HepG2. CUR 20 µM: Curcumina 20 µM; QUE 50 µM: Quercetina 50 µM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o *t*-BOOH; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

O EAC e o EEC, no regime de pré-incubação, revelaram uma viabilidade celular que variou entre 68,8% e 82,2% e 64,65 e 75,5%, respetivamente. Os extratos de cereja variedade “Lapins” mostraram uma viabilidade celular significativamente superior ao tóxico ($p < 0,001$) em todas as concentrações analisadas (Figura 17-A). No entanto, apenas o EAC na concentração de 250 µg/mL apresentou ausência de citotoxicidade em comparação ao controlo (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

No regime de co-incubação, o EAC apresentou uma viabilidade celular entre 77,0% a 92,3%, enquanto no EEC variou de 62,4% a 80,6% (Figura 17-B). O EAC e o EEC demonstraram viabilidade celular significativamente superior ao tóxico em todas as concentrações analisadas ($p < 0,05$), exceto o EEC na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que embora superior ao tóxico, não foi significativo. O EAC não apresentou citotoxicidade em comparação ao controlo nas concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto o EEC não mostrou citotoxicidade apenas na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Desta forma, verifica-se que quando comparadas duas concentrações semelhantes, o EAC foi significativamente mais eficaz na proteção das células contra o stress oxidativo do que o EEC ($p < 0,01$), exceto na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na qual não se verifica diferença significativa.

A proteção dos extratos de cereja variedade "Lapins" foi mais pronunciada no regime de co-incubação. Embora o EEC tenha mostrado um maior TPC, melhor capacidade de neutralizar os radicais livres ABTS e H_2O_2 , e de neutralizar iões metálicos em comparação ao EAC, nos ensaios de pré e co-incubação, o EAC destacou-se por possuir menor citotoxicidade (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Tal pode ser justificado pela presença de compostos antioxidantes no EAC que atuam por mecanismos diferentes dos avaliados neste trabalho, o que salienta a pertinência de realizar múltiplos ensaios para avaliar a atividade antioxidante total (H. Zhao, 2014). Além disso, a presença de compostos fenólicos, como as antocianinas, que em concentrações mais elevadas atuam como pró-oxidantes, pode justificar a maior citotoxicidade observada no EEC (A. Gonçalves et al., 2021; ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Assim sendo, constata-se que quando avaliados de forma isolada a cerveja IS-N em solvente aquoso e etanólico e os extratos de cereja variedade "Lapins" revelaram possuir maior capacidade citoprotetora quando no regime de co-incubação com *t*-BOOH, revelando uma atividade antioxidante direta, nomeadamente, através da capacidade de neutralizar radicais livres e quelar iões metálicos (Lima et al., 2006). Por outro lado, a menor capacidade citoprotetora no regime de pré-incubação revelou que os compostos presentes nas amostras em questão podem não ter tanta capacidade de prevenir ou proteger contra o stresse oxidativo, não tendo demonstrado uma aptidão significativa na modulação da atividade de enzimas antioxidantes e desintoxicantes nas células HepG2 (Carvalho et al., 2014; Lima et al., 2006).

No estudo de A. Gonçalves et al. (2021), realizado com três frações fenólicas distintas da variedade "Saco" de *P. avium* L., foi demonstrado que a cereja-doce possui a capacidade de

proteger as células HepG2 das lesões oxidativas induzidas pelo peróxido de hidrogénio e pelo óxido nítrico. Tais resultados são atribuídos ao potencial antioxidante característico das cerejas-doce, uma vez que apresentam teores consideráveis de compostos fenólicos (A. Gonçalves et al., 2021). A capacidade antioxidante desses compostos fenólicos é, em parte, atribuída à sua estrutura química, destacando-se a presença de grupos hidroxil e metoxi e resíduos de catecol, que doam radicais livres neutralizantes e espécies oxidativas, além de quelarem iões metálicos (A. Gonçalves et al., 2021).

No estudo de Caon et al. (2021) realizado em ratos, as cervejas artesanais revelaram melhorar o estado enzimático e não enzimático após exposição ao tetracloreto de carbono. O consumo moderado de cervejas artesanais resultou no aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Essas enzimas são cruciais para a defesa antioxidante do corpo, ajudando a neutralizar os radicais livres, a proteger as células do stresse oxidativo e a desempenhar um papel fundamental na desintoxicação do organismo (Caon et al., 2021). Por sua vez, no estado não enzimático, observou-se um aumento da capacidade antioxidante total no sangue dos ratos, refletindo uma maior presença de compostos fenólicos (Caon et al., 2021). Embora se verifique uma melhoria nos parâmetros mencionados, as cervejas artesanais não revelaram capacidade hepatoprotetora suficiente para superar a toxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono, verificando-se danos morfológicos a nível hepático (Caon et al., 2021).

Nas Figuras 18 e 19 estão presentes os resultados de pré e co-incubação, respetivamente, da cereja IS-N em solvente aquoso e etanólico após incorporação do EAC e do EEC.

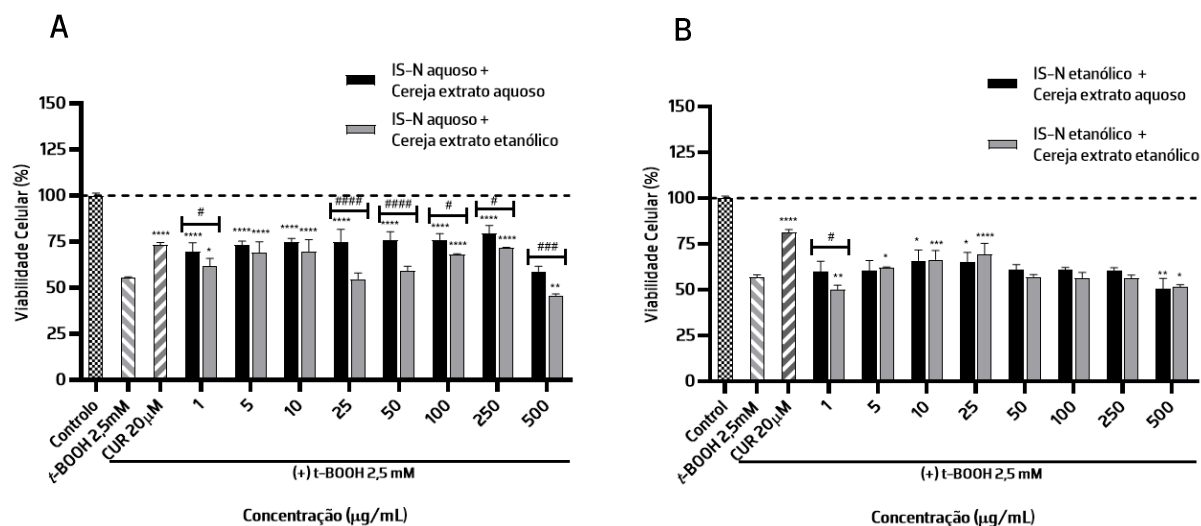


Figura 18. Efeito citoprotetor, no regime de pré-incubação, de diferentes concentrações da cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)) (A), e cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5 % (V/V)) + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70% (V/V)) (B), em células HepG2. CUR 20 μM: Curcumina 20 μM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado com o t-BOOH; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparadas duas concentrações semelhantes.

Na Figura 18-A verifica-se que quando comparadas duas concentrações semelhantes a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC obteve maior viabilidade celular (58,9%–79,6%) do que a cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC (45,9%–71,6%), no regime de pré-incubação. Apesar de várias concentrações mostrarem uma viabilidade celular significativamente maior do que a do t-BOOH ($p < 0,05$), nenhuma das concentrações demonstrou ausência de citotoxicidade em comparação ao controlo (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Na Figura 18-B constata-se que apenas nas concentrações 10 μg/mL e 25 μg/mL ambas as cervejas IS-N em solvente etanólico com adição do EAC e do EEC, no regime de pré-incubação, possuem viabilidade celular significativamente superior ao tóxico ($p < 0,05$). A cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC apresentou uma viabilidade celular que variou de 50,6% a 65,9%, enquanto na cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC variou de 50,3% a 69,3%. Desta forma, constatou-se que não existiu ausência de citotoxicidade em comparação ao controlo em nenhuma das concentrações analisadas (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

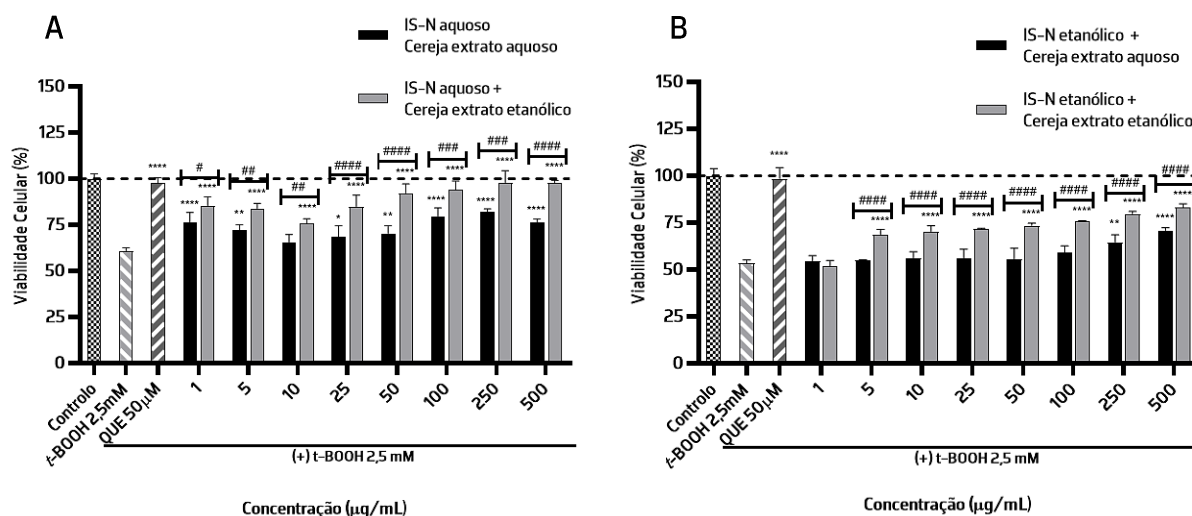


Figura 19. Efeito citoprotetor, no regime de co-incubação, de diferentes concentrações da cerveja IS-N em solvente aquoso + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70 % (V/V)) (A), e cerveja IS-N em solvente etanólico (8,5 % (V/V)) + Extrato aquoso de cereja variedade "Lapins" / Extrato etanólico de cereja variedade "Lapins" (70% (V/V)) (B), em células HepG2. QUE 50 µM: Quercetina 50 µM. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três amostras independentes (n=3), em triplicado. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 quando comparado com o t-BOOH; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,001 e #### p < 0,0001 quando comparadas duas concentrações semelhantes.

Por sua vez, no regime de co-incubação, verifica-se que quando comparadas duas concentrações semelhantes a cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC revelou possuir viabilidade celular significativamente superior à cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC, 75,8% a 98,0% e 65,4% a 82,0%, respetivamente ($p < 0,05$) (Figura 19). Ambas as cervejas, mostraram um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao tóxico ($p < 0,05$), exceto para a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC na concentração de 10 µg/mL, (Figura 19-A). A cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC não apresentou citotoxicidade na concentração de 250 µg/mL em comparação ao controlo, enquanto a cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC revelou ausência de citotoxicidade em todas as concentrações, exceto na concentração de 10 µg/mL (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

A cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC, no regime de co-incubação, apresentou uma viabilidade celular que variou entre 54,5% e 71,0%. Nesta cerveja verificou-se um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao tóxico apenas a partir da concentração de

250 µg/mL, sem indicar ausência de citotoxicidade em comparação ao controlo em nenhuma concentração (Figura 19-B) (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Por sua vez, a cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC apresentou uma viabilidade que variou de 51,8% a 83,2%, o que mostrou uma viabilidade celular significativamente superior ao tóxico em todas as concentrações ($p < 0,0001$), exceto na concentração de 1 µg/mL. No entanto, a ausência de citotoxicidade em comparação ao controlo foi observada apenas na concentração de 500 µg/mL (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018).

Quando comparadas duas concentrações semelhantes a cerveja IS-N em solvente etanólico + EEC revelou possuir viabilidade celular significativamente superior à cerveja IS-N em solvente etanólico + EAC ($p < 0,0001$), exceto na concentração de 1 µg/mL na qual não se verifica diferenças significativas.

Assim sendo, observa-se que, genericamente, a adição de EAC e EEC às garrafas de cerveja IS-N não aumentou a viabilidade celular nos ensaios de pré-incubação e co-incubação, e, conseqüentemente, não reduziu a citotoxicidade em comparação à cerveja IS-N isolada, exceto na cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC, no regime de co-incubação, que revelou citotoxicidade apenas na concentração de 10 µg/mL (ISO 10993-5:2009, 2009; Ramirez et al., 2018). Esses resultados eram esperados, já que foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade antioxidante das cervejas após a adição dos extratos, tanto no ensaio de neutralização de H_2O_2 quanto no ensaio FRAP, que mede a capacidade de neutralização de iões Fe^{3+} .

5. Conclusão

A autenticidade, inovação, criatividade e qualidade das cervejas artesanais faz com que se destaquem das demais, resultando num aumento da sua produção e consumo. A cerveja pode ser considerada uma bebida funcional devido ao seu valor nutritivo e ao enriquecimento com ingredientes que possuem propriedades benéficas para a saúde. As cervejas artesanais contêm compostos bioativos que conferem atividade antioxidante e hepatoprotetora, o que é de grande interesse tanto para consumidores quanto para produtores, pois associam uma bebida alcoólica a benefícios para a saúde.

Desta forma, o presente trabalho contribuiu para determinar os parâmetros físico-químicos das cervejas, antes e após incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins"; avaliar a atividade antioxidante do EAC e do EEC, assim como das cervejas antes e após incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins"; avaliar a toxicidade hepática das cervejas em células de HepG2; bem como avaliar o potencial hepatoprotetor, *in vitro*, das cervejas, antes e após a incorporação de extratos de cereja variedade "Lapins", contra o stress oxidativo induzido pelo t-BOOH em células HepG2.

Em relação à análise física e química, o parâmetro relativo ao teor de álcool variou de 4,8% (estilo Brown Porter) a 9,1% (estilo Imperial Stout). Em termos de cor, o valor do EBC variou de 7 (estilo Pilsner) a 185 (estilo Imperial Stout). O amargor variou de 17 IBU (cerveja industrial – estilo Sweet Stout) a 68 IBU (estilo Imperial Stout). O pH das cervejas variou entre $4,0 \pm 0,0$ (Brown Porter e Pilsner) e $4,6 \pm 0,0$ (estilo Dubbel Belga e Imperial Stout). A acidez total foi semelhante nas cervejas artesanais e industriais, variando de $0,1 \pm 0,0\%$ (estilo Brown Porter) a $0,3 \pm 0,0\%$ (estilo Imperial Stout e cerveja industrial – estilo Sweet Stout). Quanto ao TAR, os valores variaram entre $1567,5 \pm 12,5$ mg GE/L (cerveja industrial – estilo Pilsner) e $16480,0 \pm 156,6$ mg GE/L (estilo Imperial Stout). A análise física e química das cervejas é essencial para verificar as suas propriedades organolépticas e a qualidade da bebida, além de auxiliar os produtores na otimização do processo de produção.

Os compostos fenólicos desempenham papéis críticos nas propriedades sensoriais, na cor e na estabilidade coloidal da cerveja, além de contribuírem para a atividade antioxidante da mesma. Desta forma, neste trabalho o TPC foi determinado em nove cervejas artesanais e duas industriais. O TPC das cervejas artesanais variou entre $4,1 \pm 0,4$ mg GAE/g (IPA-N, estilo India Pale Ale) e $9,5 \pm 0,3$ mg GAE/g (BP-N, estilo Brown Porter), enquanto nas cervejas industriais foi de $7,6 \pm 0,1$ mg GAE/g (SS-SB, estilo Sweet Stout) e $5,0 \pm 0,1$ mg GAE/g (P-SB, estilo Pilsner). As

cervejas artesanais tendem a ter um TPC mais elevado que as cervejas industriais, devido ao uso exclusivo de ingredientes como cevada e lúpulo e à ausência de processos de filtração e pasteurização. Em contraste, as cervejeiras industriais frequentemente utilizam métodos e matérias-primas mais baratos para aumentar a rentabilidade, o que resulta num menor TPC. A quantidade de compostos fenólicos, nomeadamente catequinas, proantocianidinas, prenilchalconas, derivados de flavanonas, flavonóis, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e estilbenos, pode variar dependendo do tipo de cerveja. No entanto, o consumo desta bebida pode ser uma fonte de antioxidantes, especialmente na forma de compostos fenólicos.

A atividade antioxidante das cervejas artesanais e industriais em estudo foi determinada por quatro métodos distintos: ABTS, H_2O_2 , FRAP e ferrozina, devido à ausência de um método padrão que consiga caracterizar de forma objetiva a capacidade antioxidante total da cerveja. No ensaio ABTS, a capacidade de neutralização dos radicais $ABTS^{\cdot+}$ pelas cervejas artesanais variou de IC_{50} $123,6 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ (baixa capacidade antioxidante) a $68,3 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ (moderada capacidade antioxidante), enquanto nas cervejas industriais foi de $76,1 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ (SS-SB, estilo Sweet Stout) e $86,0 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ (P-SB, estilo Pilsner), ambas com moderada capacidade antioxidante. No ensaio H_2O_2 , todas as cervejas demonstraram alta capacidade antioxidante na neutralização do H_2O_2 , com a cerveja industrial SS-SB (estilo Sweet Stout) a possuir o melhor valor, IC_{50} de $20,2 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$. No ensaio da ferrozina, nenhuma cerveja apresentou valor de IC_{50} nas concentrações testadas (1-1000 $\mu\text{g/mL}$), indicando baixa capacidade antioxidante na quelação de iões Fe^{2+} . No ensaio do FRAP, a cerveja artesanal PA-ET (estilo Pale Ale) teve o maior valor de redução de iões Fe^{3+} , $58,6 \pm 0,0 \mu\text{mol TE/g}$, significativamente superior às demais ($p < 0,05$), enquanto a cerveja industrial P-SB (estilo Pilsner) teve o menor valor do FRAP, $20,3 \pm 0,0 \mu\text{mol TE/g}$.

Na análise de correlação apurou-se que o TPC apenas teve correlação com o ensaio H_2O_2 , sendo esta negativa ($p < 0,05$). Esse resultado, assim como a ausência de correlação entre o TPC e os restantes ensaios antioxidantes, pode ser explicado pela presença de outros compostos antioxidantes além dos fenólicos, que também neutralizam radicais livres e participam na quelação de iões metálicos. Por sua vez, a acidez total e o amargor foram correlacionados positivamente com o TPC ($p < 0,05$).

No EAC e no EEC 70% (V/V), determinou-se o TPC e a atividade antioxidante. O EEC apresentou uma quantidade significativamente maior de TPC ($5,1 \pm 0,0 \text{ mg GAE/g}$ de extrato) em comparação ao EAC ($3,6 \pm 0,0 \text{ mg GAE/g}$ de extrato), ($p < 0,05$). Os compostos fenólicos

presentes nas cerejas variedade “Lapins” pertencem essencialmente ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, antocianinas, flavonas e flavonóis. No ensaio ABTS, ambos os extratos de cereja variedade “Lapins” mostraram baixa capacidade antioxidante. No ensaio H₂O₂, o EEC apresentou capacidade antioxidante moderada (IC₅₀ de 72,6 ± 1,9 µg/mL), enquanto o EAC teve baixa capacidade antioxidante (IC₅₀ de 143,9 ± 4,3 µg/mL). No ensaio da ferrozina, nenhum dos extratos apresentou valor de IC₅₀ nas concentrações testadas (1-1000 µg/mL). No ensaio FRAP, o EEC também demonstrou uma capacidade antioxidante significativamente superior ao EAC ($p < 0,05$), com valores de 33,3 ± 0,0 µTE/g e 23,4 ± 0,0 µTE/g de extrato, respetivamente. Desta forma, constata-se que o EEC é superior ao EAC tanto no TPC quanto na capacidade antioxidante.

Quanto à toxicidade hepática, os resultados para as cervejas artesanais e industriais são semelhantes, apresentando citotoxicidade apenas a partir da concentração de 250 µg/mL. A única exceção são as cervejas industriais incubadas por 24 horas, que não mostraram citotoxicidade nas concentrações testadas. Por sua vez, os extratos de cereja variedade “Lapins” demonstraram possuir potencial para aumentar a viabilidade celular e apresentaram toxicidade hepática apenas na concentração mais alta analisada (500 µg/mL).

Após a análise isolada das cervejas artesanais e industriais, e dos extratos de cereja variedade “Lapins”, procedeu-se à adição do EAC e EEC à cerveja IS-N (estilo Imperial Stout), uma vez que foi a cerveja artesanal que reuniu os resultados mais promissores nos ensaios TPC e ensaios antioxidantes, e revelou resultados favoráveis no ensaio de viabilidade celular.

A adição de EAC e EEC resultou na diminuição significativa do pH em comparação à cerveja original ($p < 0,05$), de 4,60 ± 0,00 para 4,42 ± 0,00 (IS-N + EEC) e 4,43 ± 0,00 (IS-N + EAC), e no aumento significativo da acidez ($p < 0,05$). Estes resultados podem ser explicados pelo pH da cereja variedade “Lapins” e pela produção de ácidos orgânicos ao adicionar os extratos de cereja à cerveja engarrafada. O TAR também diminuiu significativamente com a incorporação dos extratos de cereja variedade “Lapins” ($p < 0,05$).

A adição do EEC à cerveja IS-N, reduziu significativamente o valor de TPC da cerveja original ($p < 0,05$), passando de 8,3 ± 0,2 mg GAE/g para 4,2 ± 0,1, respetivamente, enquanto a adição do EAC não despoletou diferenças significativas no valor de TPC.

No ensaio ABTS, a adição de EAC e EEC à cerveja IS-N aumentou significativamente a capacidade de neutralização dos radicais ABTS^{•+} ($p < 0,05$), resultando numa capacidade antioxidante moderada e elevada, respetivamente. No ensaio H₂O₂, a adição de EAC e EEC

diminuiu significativamente a capacidade antioxidante da cerveja final, reduzindo-a de elevada para moderada ($p < 0,05$). No ensaio da ferrozina, assim como nas amostras isoladas, não foi possível determinar o IC_{50} . No ensaio FRAP, a adição dos extratos de cereja variedade “Lapins” também reduziu significativamente a capacidade antioxidante ($p < 0,05$). Assim, a adição dos extratos de cereja variedade “Lapins” à cerveja IS-N não se mostrou promissora.

As cervejas IS-N em solvente aquoso e etanólico com adição de extratos de cereja variedade “Lapins” mostraram-se promissoras em termos de toxicidade hepática, apresentando citotoxicidade apenas na concentração mais alta, após 48 horas de incubação. A exceção foi a cerveja IS-N em solvente aquoso + EAC, que apresentou citotoxicidade até à concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de incubação. Destaca-se que a cerveja IS-N em solvente etanólico com extratos de cereja variedade “Lapins” revelou-se mais eficaz no aumento da viabilidade celular nas incubações de 24 e 48 horas.

Em relação ao potencial efeito hepatoprotetor das diferentes amostras em análise, recorreu-se aos regimes de pré e co-incubação, contra o dano causado pelo tóxico *t*-BOOH. No regime de pré-incubação a cerveja IS-N em solvente aquoso apresentou citotoxicidade em todas as concentrações analisadas, enquanto em solvente etanólico não apresentou citotoxicidade nas concentrações 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$. No regime de co-incubação a cerveja IS-N em solvente aquoso e em solvente etanólico deixaram de apresentar citotoxicidade somente a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 100 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

Nos extratos de cereja variedade “Lapins”, no regime de pré-incubação, apenas o EAC na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentou ausência de citotoxicidade. No regime de co-incubação o EAC não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o EEC não mostrou citotoxicidade na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, constata-se que quando avaliados de forma isolada a cerveja IS-N em solvente aquoso e etanólico, e os extratos de cereja variedade “Lapins” revelaram possuir maior capacidade citoprotetora no regime de co-incubação.

A adição de EAC e EEC às garrafas de cerveja IS-N não reduziu a citotoxicidade induzida pelo *t*-BOOH em comparação à cerveja IS-N isolada. A única exceção foi a cerveja IS-N em solvente aquoso + EEC no regime de co-incubação, que apresentou citotoxicidade apenas numa concentração (10 $\mu\text{g/mL}$).

Como perspetivas futuras sugere-se: a inclusão de informações sobre o teor de álcool, cor, amargor, variedades de maltes e lúpulo nos rótulos das cervejas, uma vez que a informação pode

ajudar os consumidores a selecionar cervejas com maior presença de compostos fenólicos e que atendam melhor às suas preferências sensoriais; aumentar o tamanho amostral dos estilos de cerveja já estudados, bem como expandir a análise a outros estilos de cerveja artesanais e industriais, uma vez que uma maior variedade de amostras permitirá uma análise mais robusta e representativa, possibilitando uma compreensão mais detalhada das características e variabilidades intrínsecas de cada tipo de cerveja; a determinação dos parâmetros físico-químicos, nomeadamente, teor de álcool, cor e amargor da cerveja após incorporação dos extratos de cereja, a fim de estudar a influência da adição do extrato nos parâmetros mencionados; avaliar as capacidades antioxidantes e de hepatoproteção das matérias-primas, isoladas e em associação, que compõem as cervejas em análise; incorporação de diferentes concentrações de cereja à cerveja analisada e a outros estilos de cerveja, bem como incorporação de outras frutas locais e subprodutos agroindustriais nas diversas etapas de produção, nomeadamente, no início da fervura do mosto, dado esta ser considerada a etapa mais qualificada para obtenção de maior quantidade de compostos fenólicos; realização de outras técnicas extrativas, dada a sua influência na extração de compostos fenólicos; realização de mais ensaios antioxidantes, nomeadamente, o ensaio DPPH, ORAC, ensaio capacidade de redução do íon cúprico, para complementar a análise antioxidante; realização da caracterização fitoquímica por HPLC das cervejas e extratos de cereja variedade "Lapins" isolados e das cervejas após a incorporação dos extratos de cereja variedade "Lapins", permitindo a identificação de compostos bioativos responsáveis pelas atividades antioxidante e citoprotetoras; estudar a indução das defesas celulares antioxidantes e citoprotetoras (ex: níveis de GSH e expressão proteica das enzimas citoprotetoras heme-oxigenase-1 (HO-1), NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1), e subunidades catalíticas e modificadoras da glutamato cisteína ligase (GCLC e GCLM)); bem como realização de estudos *in vivo* sobre biodisponibilidade, distribuição, eficácia e segurança para melhor se entender o potencial de saúde da cerveja artesanal funcional.

Referências Bibliográficas

- Academia Artesanal. (2018). Guia Completo do Malte. *Academia Artesanal*.
<https://academiaartesanal.com.br/guia-completo-de-maltes/>
- Acero, N., Gradillas, A., Beltran, M., García, A., & Muñoz Mingarro, D. (2019). Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium*L.) varieties. *Food Chemistry*, 279, 260–271.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.008>
- Adadi, P., Kovaleva, E. G., Glukhareva, T. V., Shatunova, S. A., & Petrov, A. S. (2017). Production and analysis of non-traditional beer supplemented with sea buckthorn. *Agronomy Research*, 15(5), 1831–1845. <https://doi.org/10.15159/AR.17.060>
- Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, 2, 721–728.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
- AECAI. (n.d.). *Informe Técnico de la Cerveza Artesana e Independiente España*.
<https://aecai.es/wp-content/uploads/2021/12/informe-cerveza-artesana-espana.pdf>
- Anderson, H. E., Liden, T., Berger, B. K., & Schug, K. A. (2021). Target profiling of beer styles by their iso- α -acid and phenolic content using liquid chromatography–quadrupole time-of-flight–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 44(14), 2764–2772.
<https://doi.org/10.1002/jssc.202100173>
- APCV– Associação Cervejeiros de Portugal. (2021). *Cervejeiros em Portugal*.
https://cdn.prod.website-files.com/6601c8f7692b53976ccd3161/663dfae49281fcabdfcae7b5_Guia_CERVEJEIROS_EM_PORTUGAL.pdf

- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2014). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, *41*, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.12.005>
- Aron, P. M., & Shellhammer, T. H. (2010). A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 369–380. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>
- ASBC. (n.d.). *Beer 8. Total acidity as "titratable acidity."* Retrieved September 30, 2024, from <https://www.asbcnet.org/Methods/BeerMethods/Pages/Beer-8-MasterMethod.aspx>
- ATCC. (2022). *Ficha técnica hepG2*. www.atc.org
- B, P., K, A., K, S., Sk, J., B, D., & K, R. (2013). Evaluation of antioxidant activity of ethanolic root extract of *Albizia lebbek* (L.) benth. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, *3*(2), Article 2.
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(2), 1829–1856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Bamforth, C. W., Muller, R. E., & Walker, M. D. (1993). Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *51*(3), 79–88. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-51-0079>
- Baxter, E. D., & Hughes, P. S. (2001). Flavour determinants of beer quality. In *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*; (pp. 40–73). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847550224-00014>

- Bharat Helkar, P., & Sahoo, A. (2016). Review: Food industry by-products used as a functional food ingredients. *International Journal of Waste Resources*, 6(3), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000248>
- Bhattacharjee, M., Kamal, R., & Roy, L. (2016). Evaluation of free radical scavenging activity of 'Prunus avium.' *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 38(2), 1–5.
- Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., & Malik, S. A. (2015). Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Research Notes*, 8, 279. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>
- Boronat, A., Soldevila-Domenech, N., Rodríguez-Morató, J., Martínez-Huélamo, M., Lamuela-Raventós, R. M., & De La Torre, R. (2020). Beer phenolic composition of simple phenols, prenylated flavonoids and alkylresorcinols. *Molecules*, 25(11), 2582. <https://doi.org/10.3390/molecules25112582>
- Borşa, A., Muntean, M. V., Salanţă, L. C., Tofană, M., Socaci, S. A., Mudura, E., Pop, A., & Pop, C. R. (2022). Effects of botanical ingredients addition on the bioactive compounds and quality of non-alcoholic and craft beer. *Plants*, 11(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/plants11151958>
- Bortoleto, G. G., Gomes, W. P. C., Ushimura, L. C., Bonanca, R. A., & Novello, E. H. (2022). Evaluation of the profile of volatile organic compounds in industrial and craft beers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(2), 5532. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5532>
- Breda, C., Barros, A. I., & Gouvinhas, I. (2022). Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 100473. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100473>

- Brewers Association. (n.d.). *Craft Brewer Definition*. Retrieved July 13, 2024, from <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
- Březinová, M. (2021). Beer industry in the Czech Republic: Reasons for founding a craft brewery. *Sustainability*, *13*(17), 9680. <https://doi.org/10.3390/su13179680>
- Buiatti, S. (2008). Beer composition: An overview. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 213–225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00020-1>
- Bustos, L., Soto, E., Parra, F., Echiburu-Chau, C., & Parra, C. (2019). Brewing of a Porter craft beer enriched with the plant *Parastrephia lucida*: A promising source of antioxidant compounds. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *77*(4), 261–266. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1644478>
- Calumba, K. F., Reyes, V., Bonilla, F., Villasmil, E., & Sathivel, S. (2021). Ale beer containing free and immobilized *Lactobacillus brevis*, a potential delivery system for probiotics. *Food Production, Processing and Nutrition*, *3*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00051-3>
- Canonico, L., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2021). Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *LWT - Food Science and Technology*, *145*, 111361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111361>
- Caon, G., Morrone, M., Feistauer, L., Sganzerla, D., & Moreira, J. C. F. (2021). Moderate beer consumption promotes silymarin-like redox status without affecting the liver integrity in vivo. *Food Bioscience*, *43*, 101307. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101307>
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added.

International Journal of Food Microbiology, 284, 22–30.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>

Carvalho, A. C., Franklin, G., Dias, A. C. P., & Lima, C. F. (2014). Methanolic extract of *Hypericum perforatum* cells elicited with *Agrobacterium tumefaciens* provides protection against oxidative stress induced in human HepG2 cells. *Industrial Crops and Products*, 59, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.018>

Catalão, M. B. J. (2016). *Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades antimicrobianas de cerejas do Fundão* [Universidade da Beira Interior]. <http://hdl.handle.net/10400.6/5847>

Censi, R., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Lupidi, G., Angeloni, C., Pruccoli, L., Tarozzi, A., & Martino, P. D. (2021). New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. *Cosmetics*, 8(4), 96. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040096>

Cervejeiros de Portugal. (n.d.). *Estilos de Cerveja*. Retrieved June 20, 2023, from <https://www.cervejeirosdeportugal.pt/variedades/>

Chan, M. Z. A., Chua, J. Y., Toh, M., & Liu, S.-Q. (2019). Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiology*, 82, 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.001>

Chen, X., Li, L., Yang, H., & Zhou, H. (2022). Effects of the addition of *Dendrobium officinale* on beer yeast fermentation. *Fermentation*, 8(11), 595. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110595>

Chiva-Blanch, G., Magraner, E., Condines, X., Valderas-Martínez, P., Roth, I., Arranz, S., Casas, R., Navarro, M., Hervas, A., Sisó, A., Martínez-Huélamo, M., Vallverdú-Queralt, A., Quifer-

- Rada, P., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2015). Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *25*(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.07.008>
- Cho, J.-H., Kim, I.-D., Dhungana, S. K., Do, H.-M., & Shin, D.-H. (2018). Persimmon fruit enhanced quality characteristics and antioxidant potential of beer. *Food Science and Biotechnology*, *27*(4), 1067–1073. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0340-2>
- Chockchaisawasdee, S., Golding, J. B., Vuong, Q. V., Papoutsis, K., & Stathopoulos, C. E. (2016). Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. *Trends in Food Science & Technology*, *55*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.002>
- Cirlincione, F., Pirrone, A., Gugino, I. M., Todaro, A., Naselli, V., Francesca, N., Alfonzo, A., Mirabile, G., Ferraro, V., Balenzano, G., & Gargano, M. L. (2023). Technological and organoleptic parameters of craft beer fortified with powder of the culinary–medicinal mushroom *Pleurotus eryngii*. *Journal of Fungi*, *9*(10), 1000. <https://doi.org/10.3390/jof9101000>
- Clodoveo, M. L., Crupi, P., Muraglia, M., Naeem, M. Y., Tardugno, R., Limongelli, F., & Corbo, F. (2023). The main phenolic compounds responsible for the antioxidant capacity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) pulp. *LWT*, *185*, 115085. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115085>
- Collin, S., Jerkovic, V., Bröhan, M., & Callemien, D. (2013). Polyphenols and beer quality. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 2333–2359). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_78
- Collins, M. A., Neafsey, E. J., Mukamal, K. J., Gray, M. O., Parks, D. A., Das, D. K., & Korthuis, R. J. (2009). Alcohol in moderation, cardioprotection, and neuroprotection: Epidemiological

- considerations and mechanistic studies. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *33*(2), 206–219. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00828.x>
- Correia, S., Schouten, R., Silva, A. P., & Gonçalves, B. (2017). Factors affecting quality and health promoting compounds during growth and postharvest life of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Frontiers in Plant Science*, *8*, 2166. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02166>
- Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Peregrina, D. V., Sagratini, G., Censi, R., & Di Martino, P. (2020). Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1612*, 460622. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622>
- Cunha, A. C. D., Lopes, N. D., Barcia, M. T., Sautter, C. K., & Augusto Ballus, C. (2023). Production and characterization of craft beers with different additions of native fruits and agro-industrial residues: A review. *Ciência Rural*, *53*(9), e20220194. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220194>
- Deng, Y., Lim, J., Nguyen, T. T. H., Mok, I.-K., Piao, M., & Kim, D. (2020). Composition and biochemical properties of ale beer enriched with lignans from *Schisandra chinensis* Baillon (omija) fruits. *Food Science and Biotechnology*, *29*(5), 609–617. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00714-5>
- Disegno di Legge N. 1328-B, Art.35. (2017). *Senato Della Repubblica*. <https://www.parlamento.it/service/PDF/PDFServer/DF/319356.pdf>
- Djordjevic, S., Popovic, D., Despotovic, S., Veljovic, M., Atanackovic, M., Cvejic, J., Nedovic, V., & Leskosek-Cukalovic, I. (2016). Extracts of medicinal plants as functional beer additives. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, *22*(3), 301–308. <https://doi.org/10.2298/CICEQ150501044D>

- Donadini, G., & Porretta, S. (2016). Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Research International*, *91*, 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.043>
- Dorn, C., Kraus, B., Motyl, M., Weiss, T. S., Gehrig, M., Schölmerich, J., Heilmann, J., & Hellerbrand, C. (2010). Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Molecular Nutrition and Food Research*, *54*, 205–213. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900314>
- Duarte, J. B., & Brinca, P. (2021). *Setor cervejeiro—Avaliação de impactos macroeconómicos*. https://pedrobrinca.pt/wp-content/uploads/2022/01/Impactos-Macroeconomicos-do-Setor-Cervejeiro_Relatorio-Final-1.pdf
- Ducruet, J., Rébénaque, P., Diserens, S., Kosin'ska, A., Kosin'ska-Cagnazzo, K., Héritier, I., & Andlauer, W. (2017). Amber ale beer enriched with goji berries—The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food Chemistry*, *226*, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.047>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* species tolerant to brewing-related stress factors for controlled and rapid production of sour beer. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
- Elrod, S. M., Langley, C., Greenspan, P., & Hofmeister, E. (2019). Relationship between phenolic and antioxidant concentration of *Humulus lupulus* and alpha acid content. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *77*(2), 134–139. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1587701>

- EZbrew. (2021). *Principais tipos de maltes cervejeiros e suas diferenças*.
<https://ezbrew.com.br/principais-tipos-de-maltes-cervejeiros-e-suas-diferencas/>
- Faienza, M. F., Corbo, F., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M. L., Grano, M., Wang, D. Q.-H., D'Amato, G., Muraglia, M., Franchini, C., Brunetti, G., & Portincasa, P. (2020). Novel insights in health-promoting properties of sweet cherries. *Journal of Functional Foods*, *69*, 103945. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103945>
- Ferk, F., Huber, W. W., Filipič, M., Bichler, J., Haslinger, E., Mišák, M., Nersesyan, A., Grasl-Kraupp, B., Žegura, B., & Knasmüller, S. (2010). Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *261*(1–2), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.06.006>
- Gaetano, G., Costanzo, S., Castelnuovo, A. D., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A., Chiva-Blanch, G., Estruch, R., La Vecchia, C., Panico, S., Pounis, G., Sofi, F., Stranges, S., Trevisan, M., Ursini, F., Cerletti, C., Donati, M. B., & Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, *26*(6), 443–467. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007>
- Gonçalves, A. C., Bento, C., Silva, B. M., & Silva, L. R. (2017). Sweet cherries from Fundão possess antidiabetic potential and protect human erythrocytes against oxidative damage. *Food Research International*, *95*, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.023>
- Gonçalves, A., Flores-Félix, J. D., Costa, A. R., Falcão, A., Alves, G., & Silva, L. R. (2021). Hepatoprotective effects of sweet cherry extracts (cv. Saco). *Foods*, *10*(11), 2623. <https://doi.org/10.3390/foods10112623>

- Gonçalves, B., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E., & Meyer, A. S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, *103*(3), 976–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.039>
- Gouvinhas, I., Breda, C., & Barros, A. I. (2021). Characterization and discrimination of commercial portuguese beers based on phenolic composition and antioxidant capacity. *Foods*, *10*(5), 1144. <https://doi.org/10.3390/foods10051144>
- Granato, D., Branco, G. F., Faria, J. D. A. F., & Cruz, A. G. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*, 563–571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4222>
- Grupo Marktest. (2022). *Notícia: 686 mil consumidores de cerveja artesanal*. <https://www.marktest.com/wap/a/n/id-290a.aspx>
- Habschied, K., Lončarić, A., & Mastanjević, K. (2020). Screening of polyphenols and antioxidative activity in industrial beers. *Foods*, *9*(2), 238. <https://doi.org/10.3390/foods9020238>
- Habschied, K., Živković, A., Krstanović, V. K., & Mastanjević, K. M. (2020). Functional beer—A review on possibilities. *Beverages*, *6*(3), 51. <https://doi.org/10.3390/beverages6030051>
- Haffner, F. B., & Pasc, A. (2018). Freeze-dried alginate-silica microparticles as carriers of probiotic bacteria in apple juice and beer. *LWT - Food Science and Technology*, *91*, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.050>
- Hayaloglu, A. A., & Demir, N. (2015). Physicochemical characteristics, antioxidant activity, organic acid and sugar contents of 12 sweet cherry (*Prunus Avium* L.) cultivars grown in Turkey. *Journal of Food Science*, *80*(3), 564–570. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12781>

- Hayaloglu, A. A., & Demir, N. (2016). Phenolic compounds, volatiles, and sensory characteristics of twelve sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Turkey. *Journal of Food Science*, *81*(1), 7–18. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13175>
- Hempel, C., & Hamm, U. (2016). How important is local food to organic-minded consumers? *Appetite*, *96*, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.09.036>
- Herkenhoff, M. E., Battistini, C., Praia, A. B., Rossini, B. C., Dos Santos, L. D., Brödel, O., Frohme, M., & Saad, S. M. I. (2023). The combination of omics strategies to evaluate starter and probiotic strains in the Catharina sour Brazilian-style beer. *Food Research International*, *167*, 112704. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112704>
- Horincar, G., Enachi, E., Bolea, C., Râpeanu, G., & Aprodu, I. (2020). Value-added lager beer enriched with eggplant (*Solanum melongena* L.) peel extract. *Molecules*, *25*(3), 731. <https://doi.org/10.3390/molecules25030731>
- Horn, P. A., Pedron, N. B., Junges, L. H., Rebelo, A. M., Da Silva Filho, H. H., & Zeni, A. L. B. (2021). Antioxidant profile at the different stages of craft beers production: The role of phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, *247*, 439–452. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03637-2>
- Hu, T., Subbiah, V., Wu, H., Bk, A., Rauf, A., Alhumaydhi, F. A., & Suleria, H. A. R. (2021). Determination and characterization of phenolic compounds from Australia-Grown sweet cherries (*Prunus avium* L.) and their potential antioxidant properties. *ACS Omega*, *6*, 34687–34699. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05112>
- Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. D. C., & Padilha, F. F. (2019). Beer molecules and its sensory and biological properties: A review. *Molecules*, *24*(8), 1568. <https://doi.org/10.3390/molecules24081568>

- Hyun, J., Han, J., Lee, C., Yoon, M., & Jung, Y. (2021). Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5717. <https://doi.org/10.3390/IJMS22115717>
- Independent Brewers Association*. (2018). <https://iba.org.au/Public/Public/Resources-folder/FAQ.aspx?hkey=9402de6e-0e6d-47b7-b933-6710203f740f>
- ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. (2009). *International Organization for Standardization*.
- Jaeger, S. R., Worch, T., Phelps, T., Jin, D., & Cardello, A. V. (2020). Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. Traditional-style flavor preferences. *Food Quality and Preference*, *82*, 103884. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103884>
- Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative analysis of reducing sugars by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques* (pp. 181–183). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43
- Jaskula-Goiris, B., Goiris, K., Syryn, E., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., & De Cooman, L. (2014). The use of hop polyphenols during brewing to improve flavor quality and stability of pilsner beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *72*(3), 175–183. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-0616-01>
- Jesús Callejo, M., Tesfaye, W., Carmen González, M., & Morata, A. (2019). Craft beers: Current situation and future trends. In *New Advances on Fermentation Processes* (pp. 1–18). Rosa María Martínez-Espinosa. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90006>
- Kantharaj, V., Yoon, Y.-E., Lee, K.-A., Choe, H., Chohra, H., Seo, W. D., Kim, Y.-N., & Lee, Y. B. (2023). Saponarin, a di-glycosyl flavone from barley (*Hordeum vulgare* L.): An effective

- compound for plant defense and therapeutic application. *ACS Omega*, 8(25), 22285–22295. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00267>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*, 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Keersmaecker, J. D. (1996). The mystery of Lambic beer. *Scientific American*, 275(2), 74–80.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars: Chemical constituents of sweet cherry. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2530–2537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02777.x>
- Kerpes, R., Fischer, S., & Becker, T. (2017). The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.004>
- Kim, C.-Y., Jang, K.-S., Kwon, O.-H., Jeon, S.-G., Kwon, J.-B., Kumar Dhungana, S., Mun, J.-H., Park, Y., & Kim, I.-D. (2017). Addition of green pepper enhanced antioxidant potential and overall acceptance of beer. *International Journal of Sciences*, 6, 49–54. <https://doi.org/10.18483/ijSci.1288>
- Kobus-Cisowska, J., Szymanowska-Powalowska, D., Szczepaniak, O., Kmiecik, D., Przeor, M., Gramza-Michałowska, A., Cielecka-Piontek, J., Smuga-Kogut, M., & Szulc, P. (2019). Composition and in vitro effects of cultivars of *Humulus lupulus* L. hops on cholinesterase activity and microbial growth. *Nutrients*, 11(6), 1377. <https://doi.org/10.3390/NU11061377>

- Koppes, L. L. J., Dekker, J. M., Hendriks, H. F. J., Bouter, L. M., & Heine, R. J. (2005). Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *28*(3), 719–725. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.3.719>
- Koren, D., Kun, S., Hegyesné Vecseri, B., & Kun-Farkas, G. (2019). Study of antioxidant activity during the malting and brewing process. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(8), 3801–3809. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03851-1>
- Koren, D., Orbán, C., Galló, N., Kun, S., Vecseri-Hegyes, B., & Kun-Farkas, G. (2017). Folic acid content and antioxidant activity of different types of beers available in Hungarian retail. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(5), 1158–1167. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2503-1>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Microbiol Biotechnol*, *42*, 769–778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>
- Kučera, O., Endlicher, R., Roušar, T., Lotková, H., Garnol, T., Drahotka, Z., & Červinková, Z. (2014). The effect of *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes *in vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 752506. <https://doi.org/10.1155/2014/752506>
- Kuete, V., & Efferth, T. (2010). Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology*, *1*, 123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00123>
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, *64*(3), 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7)

- Lamuella-Raventós, R. M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 107–115). <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
- Lazze, M. (2003). Anthocyanins protect against DNA damage induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535(1), 103–115. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00285-1)
- Lee, Y.-H., Kim, J.-H., Kim, S. H., Oh, J. Y., Kim, K.-M., Jung, J.-C., & Jung, Y.-S. (2016). Barley sprouts extract attenuates alcoholic fatty liver injury in mice by reducing inflammatory response. *Nutrients*, 8(7), 440. <https://doi.org/10.3390/nu8070440>
- Lee, Y.-J., Beak, S.-Y., Choi, I., & Sung, J.-S. (2018). Quercetin and its metabolites protect hepatocytes against ethanol-induced oxidative stress by activation of Nrf2 and AP-1. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 809–817. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0287-8>
- Leskosek-Cukalovic, I., Despotovic, S., Lakic, N., Niksic, M., Nedovic, V., & Tesevic, V. (2010). Ganoderma lucidum-Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International*, 43, 2262–2269. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.014>
- Letenneur, L., Larrieu, S., & Barberger-Gateau, P. (2004). Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: A review of epidemiological studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.12.004>

- Li, G., & Liu, F. (2015). Changes in organic acids during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(3), 275–279. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0509-01>
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79(21), 2056–2068. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.042>
- Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from *t*-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 167(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
- Liu, M., Hansen, P. E., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., Qian, Z., Yang, M., & Miao, J. (2015). Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/molecules20010754>
- Mack, D. R. (2005). Probiotics. *Canadian Family Physician*, 1455–1457.
- Marques, D. R., Cassis, M. A., Quelhas, J. O. F., Bertozzi, J., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., & Monteiro, A. R. G. (2017). Characterization of craft beers and their bioactive compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1747–1752. <https://doi.org/10.3303/CET1757292>
- Martínez, A., Vegara, S., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2017). Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base: Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 319–327. <https://doi.org/10.1002/jib.434>

- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. *Biomolecules*, *10*(3), 400. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>
- Martini, S., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2017). Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *Food Research International*, *97*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.030>
- Mascia, I., Fadda, C., Dostálek, P., Olšovská, J., & Caro, A. D. (2014). Preliminary characterization of an Italian craft durum wheat beer. *The Institute of Brewing & Distilling*, *120*, 495–499. <https://doi.org/10.1002/jib.176>
- Mastanjević, K., Krstanović, V., Lukinac, J., Jukić, M., Lučan, M., & Mastanjević, K. (2019). Craft brewing – is it really about the sensory revolution? *Kvasny Prumsyl*, *65*(1), 13–16. <https://doi.org/10.18832/kp2019.65.13>
- Mayer, H., Ceccaroni, D., Marconi, O., Sileoni, V., Perretti, G., & Fantozzi, P. (2015). Development of an all rice malt beer: A gluten free alternative. *LWT - Food Science and Technology*, *67*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.037>
- Mehlig, K., Skoog, I., Guo, X., Schutze, M., Gustafson, D., Waern, M., Ostling, S., Bjorkelund, C., & Lissner, L. (2007). Alcoholic beverages and incidence of dementia: 34-Year follow-up of the prospective population study of women in Goteborg. *American Journal of Epidemiology*, *167*(6), 684–691. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm366>
- Mendes, M. C., Navalho, S., Ferreira, A., Paulino, C., Figueiredo, D., Silva, D., Gao, F., Gama, F., Bombo, G., Jacinto, R., Aveiro, S. S., Schulze, P. S. C., Gonçalves, A. T., Pereira, H., Gouveia, L., Patarra, R. F., Abreu, M. H., Silva, J. L., Navalho, J., ... Speranza, L. G. (2022). Algae as food in Europe: An overview of species diversity and their application. *Foods*, *11*(13), 1871. <https://doi.org/10.3390/foods11131871>

- Meza-Márquez, O. G., Rodríguez-Híjar, A. R., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., & Ramos-Monroy, O. A. (2024). The prediction of quality parameters of craft beer with FT-MIR and chemometrics. *Foods*, *13*(8), 1157. <https://doi.org/10.3390/foods13081157>
- Miranda, C. L., Stevens, J. F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M. L., & Buhler, D. R. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(9), 3876–3884. <https://doi.org/10.1021/jf0002995>
- Mitić, S. S., Paunović, D. Đ., Pavlović, A. N., Tošić, S. B., Stojković, M. B., & Mitić, M. N. (2014). Phenolic profiles and total antioxidant capacity of marketed beers in Serbia. *International Journal of Food Properties*, *17*(4), 908–922. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.680223>
- Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2013*, 716861. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., & Fantozzi, P. (1999). Organic and phenolic acids in beer. *LWT - Food Science and Technology*, *32*(8), 535–539. <https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0593>
- Moura-Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D. D., De 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>
- Mukaka, M. M. (2012). A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, *24*(3), 69–71.

- Mulero-Cerezo, J., Briz-Redón, Á., & Serrano-Aroca, Á. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*: Valuable probiotic starter for craft beer production. *Applied Sciences*, *9*(16), 3250. <https://doi.org/10.3390/app9163250>
- Museu da Cerveja*. (n.d.). Retrieved August 7, 2024, from <https://www.museudacerveja.pt/cerveja/>
- Nardini, M., & Foddai, M. S. (2020). Phenolics profile and antioxidant activity of special beers. *Molecules*, *25*(11), 2466. <https://doi.org/10.3390/molecules25112466>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2020). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, *305*, 125437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>
- Nedyalkov, P., Bakardzhiyski, I., Dinkova, R., Shopska, V., & Kaneva, M. (2022). Influence of the time of bilberry (*Vaccinium Myrtillus*L.) addition on the phenolic and protein profile of beer. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, *21*(1), 5–15. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2022.1005>
- Nedyalkov, P., Bakardzhiyski, I., Shikov, V., Kaneva, M., & Shopska, V. (2023). Possibilities for utilization of cherry products (juice and pomace) in beer production. *Beverages*, *9*(4), 95. <https://doi.org/10.3390/beverages9040095>
- Neto, J. R. O., Oliveira, T. S., Ghedini, P. C., Vaz, B. G., & Gil, E. D. S. (2017). Antioxidant and vasodilatory activity of commercial beers. *Journal of Functional Foods*, *34*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.019>
- Nizioł-Lukaszewska, Z. (2018). Extracts of cherry and sweet cherry fruit as active ingredients of body wash formulations. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *47*(1), 100–107. <https://doi.org/10.15835/nbha47111212>

- Nunes, A. R., Gonçalves, A. C., Pinto, E., Amaro, F., Flores-Félix, J. D., Almeida, A., Guedes De Pinho, P., Falcão, A., Alves, G., & Silva, L. R. (2022). Mineral content and volatile profiling of *Prunus avium* L. (sweet sherry) by-products from Fundão region (Portugal). *Foods*, *11*(5), 751. <https://doi.org/10.3390/foods11050751>
- Nur Alam, M., Jahan Bristi, N., & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Nyhan, L., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2023). Co-fermentation of non-*Saccharomyces* yeasts with *Lactiplantibacillus plantarum* FST 1.7 for the production of non-alcoholic beer. *European Food Research and Technology*, *249*(1), 167–181. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04142-4>
- Oak, M.-H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.-H., Lee, H.-H., & Schini-Kerth, V. B. (2018). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, *122*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018>
- Ocloo, F. C. K., & Ayernor, G. S. (2008). Physical, chemical and microbiological changes in alcoholic fermentation of sugar syrup from cassava flour. *African Journal of Biotechnology*, *7*(2), 164–168. <https://doi.org/10.5897/AJB08.531>
- Okechukwu, Q. N., Adadi, P., & Kovaleva, E. G. (2022). Production and analysis of beer supplemented with *Chlorella vulgaris* powder. *Fermentation*, *8*(11), 581. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110581>
- Oladokun, O., James, S., Cowley, T., Dehrmann, F., Smart, K., Hort, J., & Cook, D. (2017). Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. *Food Chemistry*, *230*, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.031>

- Oladokun, O., Tarrega, A., James, S., Smart, K., Hort, J., & Cook, D. (2016). The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry*, *205*, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.023>
- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, *256*, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>
- Olas, B. (2020). Beer components and their beneficial effect on the hemostasis and cardiovascular diseases– truth or falsehood. *Food and Chemical Toxicology*, *146*, 111782. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111782>
- Pai, T. V., Sawant, S. Y., Ghatak, A. A., Chaturvedi, P. A., Gupte, A. M., & Desai, N. S. (2015). Characterization of Indian beers: Chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(3), 1414–1423. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1152-2>
- Paiva, R. A. M., Mutz, Y. S., & Conte-Junior, C. A. (2021). A review on the obtaining of functional beers by addition of non-cereal adjuncts rich in antioxidant compounds. *Antioxidants*, *10*(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/antiox10091332>
- Park, H., Lee, E., Kim, Y., Yoon Jung, H., Kim, K.-M., & Kwon, O. (2021). Metabolic profiling analysis reveals the potential contribution of barley sprouts against oxidative stress and related liver cell damage in habitual alcohol drinkers. *Antioxidants*, *10*(3), 459. <https://doi.org/10.3390/antiox10030459>
- Pascoe, H. M., Ames, J. M., & Chandra, S. (2003). Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in Ale. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *61*(4), 203–209. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-61-0203>

- Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. A. (2014). Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chemistry*, *164*, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.118>
- Petrón, M. J., Andrés, A. I., Esteban, G., & Timón, M. L. (2021). Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. *Journal of Cereal Science*, *98*, 103162. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103162>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Piazzon, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(19), 10677–10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>
- Pilli, T., Lopriore, G., Montemitro, M., & Alessandrino, O. (2019). Effects of two sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L., cvv. 'Ferrovía' and 'Lapins') on the shelf life of an innovative bakery product. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(1), 310–320. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3491-5>
- Pinto, C., Cestero, J. J., Rodríguez-Galdón, B., & Macías, P. (2014). Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicology Reports*, *1*, 726–733. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.09.004>
- Pinto, C., Duque, A. L., Rodríguez-Galdón, B., Cestero, J. J., & Macías, P. (2012). Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3405–3412. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.035>

- Pires, J. S., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, 1–5.
- Pokrivčák, J., Supeková, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Tóth, M., & Vašina, R. (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(1), 63–74.
- Portaria n.º 91/2022, de 9 de fevereiro, do Ministério da Economia e Transição Digital e Agricultura. (2022). *Diário Da República, 1.ª Série*. www.dre.pt
- Praia, A. B., Herkenhoff, M. E., Broedel, O., Frohme, M., & Saad, S. M. I. (2022). Sour beer with *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *Paracasei* F19: Feasibility and influence of supplementation with *Spondias mombin* L. juice and/or by-product. *Foods*, 11(24), 4068. <https://doi.org/10.3390/foods11244068>
- Quesada-Molina, M., Muñoz-Garach, A., Tinahones, F. J., & Moreno-Indias, I. (2019). A new perspective on the health benefits of moderate beer consumption: Involvement of the gut microbiota. *Metabolites*, 9(11), 272. <https://doi.org/10.3390/METAB09110272>
- Ramirez, T., Strigun, A., Verlohner, A., Huener, H.-A., Peter, E., Herold, M., Bordag, N., Mellert, W., Walk, T., Spitzer, M., Jiang, X., Sperber, S., Hofmann, T., Hartung, T., Kamp, H., & Van Ravenzwaay, B. (2018). Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. *Archives of Toxicology*, 92(2), 893–906. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2079-6>
- Re, R., Pellegrin, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

- Reinoso-Carvalho, F., Dakduk, S., Wagemans, J., & Spence, C. (2019). Dark vs. light drinks: The influence of visual appearance on the consumer's experience of beer. *Food Quality and Preference*, *74*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.01.001>
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2019). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Food Science and Nutrition*, *59*(3), 462–473. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
- Rodrigo, S., Young, S. D., Cook, D., Wilkinson, S., Clegg, S., Bailey, E. H., Mathers, A. W., & Broadley, M. R. (2015). Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer. *Food Chemistry*, *182*, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.121>
- Rodrigues, I., Rodrigues, N., Marx, Í. M. G., Veloso, A. C. A., Ramos, A. C., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2020). Discrimination of sweet cherry cultivars based on electronic tongue potentiometric fingerprints. *Applied Sciences*, *10*(20), 7053. <https://doi.org/10.3390/app10207053>
- Rosales, A., Talaverano, M. I., Lozano, J., Sánchez-Vicente, C., Santamaría, Ó., García-Latorre, C., & Rodrigo, S. (2021). Craft beer vs industrial beer: Chemical and sensory differences. *British Food Journal*, *123*(12), 4332–4346. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2021-0074>
- Saeed, R. A., Khan, M. I., Butt, M. S., & Faisal, M. N. (2023). Phytochemical screening of *Prunus avium* for its antioxidative and anti-mutagenic potential against DMBA-induced hepatocarcinogenesis. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1132356. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1132356>
- Salant, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Pop, C. R., Tofană, M., Mudura, E., Bors, A., Pasqualone, A., & Zhao, H. (2020). Non-alcoholic and craft beer production and challenges. *Processes*, *8*(11), 1382. <https://doi.org/10.3390/pr8111382>

- Santos, D. R. N. D., Bilac, C. A., Muratori Barbosa, T., & Orsi, D. C. (2022). Physicochemical characterization of craft beers produced with passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Experimental Agriculture International*, 44(2), 16–23. <https://doi.org/10.9734/jeai/2022/v44i230794>
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Pérez-Jiménez, J. (2009). What contribution is beer to the intake of antioxidants in the diet? In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 441–448). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00042-0>
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., & Duarte, C. M. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.088>
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2741–2745. <https://doi.org/10.1021/jf0479160>
- SIBA Journal. (2017). *SIBA Journal-Society of Independent Brewers' Magazine*, 7.
- Silva, L. C., De Souza Lago, H., Rocha, M. O. T., De Oliveira, V. S., Laureano-Melo, R., Stutz, E. T. G., De Paula, B. P., Martins, J. F. P., Luchese, R. H., Guerra, A. F., & Rodrigues, P. (2021). Craft beers fermented by potential probiotic yeast or *Lactobacilli* strains promote antidepressant-like behavior in Swiss Webster mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(3), 698–708. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09736-6>
- Silva, R. (2018). *Estatuto da associação brasileira das microcervejarias—Abracerva*. <https://abracerva.com.br/sobre/estatuto/>

- Silva, S., Oliveira, A., Cruz, A., Oliveira, R., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical properties and antioxidant activity of portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, *27*(22), 8007. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>
- Spagnuolo, C., Tedesco, I., Volpe, M. G., Bilotto, S., Russo, M., & Russo, G. L. (2014). Cytotoxic properties of lyophilized beers in a malignant cell line. *Food and Nutrition Sciences*, *5*(1), 45–51. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.51006>
- Steiner, E., Becker, T., & Gastl, M. (2010). Turbidity and haze formation in beer—Insights and overview. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 360–368. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00787.x>
- Su, X., Yu, M., Wu, S., Ma, M., Su, H., Guo, F., Bian, Q., & Du, T. (2022). Sensory lexicon and aroma volatiles analysis of brewing malt. *Npj Science of Food*, *6*(1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00135-5>
- Sun, L., Zhang, Z., Xin, G., Sun, B., Bao, X., Wei, Y., Zhao, X., & Xu, H. (2020). Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, *96*, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.018>
- Tan, L. L., Ang, K. L., & Loo, S. C. J. (2023). Alginate encapsulation improves probiotics survival in carbonated sodas and beers. *Plos One*, *18*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283745>
- Tedesco, I., Nappo, A., Petitto, F., Iacomino, G., Nazzaro, F., Palumbo, R., & Russo, G. L. (2005). Antioxidant and cytotoxic properties of lyophilized beer extracts on HL-60 cell line. *Nutrition and Cancer*, *52*(1), 74–83. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5201_10
- The Brewers of Europe. (2020). *The contribution made by beer to the European Economy*. Europe Economics. <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms->

files/documents/publications/2020/contribution-made-by-beer-to-EU-economy-2020.pdf

- Thesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. *Current Protocols in Microbiology*, 54(1), e91. <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>
- Thilagavathi, R., Begum, S. S., Varatharaj, S. D., Balasubramaniam, A. kumar, George, J. S., & Selvam, C. (2023). Recent insights into the hepatoprotective potential of medicinal plants and plant-derived compounds. *Phytotherapy Research*, 37(5), 2102–2118. <https://doi.org/10.1002/ptr.7821>
- Tirado-Kulieva, V. A., Hernández-Martínez, E., Himbler Minchán-Velayarce, H., Pasapera-Campos, S. E., & Luque-Vilca, O. M. (2023). A comprehensive review of the benefits of drinking craft beer: Role of phenolic content in health and possible potential of the alcoholic fraction. *Current Research in Food Science*, 6, 100477. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100477>
- Uchida, M., & Ono, M. (1999). Determination of hydrogen peroxide in beer and its role in beer oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(4), 145–150. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0145>
- Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the addition of propolis extract on bioactive compounds and antioxidant activity of craft beer. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>
- Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C. dos, & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, 1–6.

- Usenik, V., Fabčič, J., & Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, *107*, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.004>
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, *131*(2), 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.086>
- Vavoura, M. V., Badeka, A. V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2015). Characterization of four popular sweet cherry cultivars grown in Greece by volatile compound and physicochemical data analysis and sensory evaluation. *Molecules*, *20*(2), 1922–1940. <https://doi.org/10.3390/molecules20021922>
- Viegas, O., Žegura, B., Pezdric, M., Novak, M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., & Filipič, M. (2012). Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(3–4), 949–955. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.031>
- Vilas-Boas, A. A., Campos, D. A., Nunes, C., Ribeiro, S., Nunes, J., Oliveira, A., & Pintado, M. (2020). Polyphenol extraction by different techniques for valorisation of non-compliant portuguese sweet cherries towards a novel antioxidant extract. *Sustainability*, *12*(14), 5556. <https://doi.org/10.3390/su12145556>
- Vivian, A., Aoyagui, C., Oliveira, D., & Catharino, R. (2016). Mass spectrometry for the characterization of brewing process. *Food Research International*, *89*, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.008>
- Wang, S. Y. (2006). Effect of pre-harvest conditions on antioxidant capacity in fruits. *Acta Horti*, *712*, 299–306. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.712.33>

World Health Organization. (2018). *Global status report on alcohol and health 2018* (Vol. 65, Issue 1).

World Health Organization. (2022). *Alcohol, recorded per capita (15+) consumption (in litres of pure alcohol)*. [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/alcohol-recorded-per-capita-\(15-\)-consumption-\(in-litres-of-pure-alcohol\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/alcohol-recorded-per-capita-(15-)-consumption-(in-litres-of-pure-alcohol))

Wu, J., Zhang, Y., Qiu, R., Li, L., & Zong, X. (2024). Effects of tea addition on antioxidant capacity, volatiles, and sensory quality of beer. *Food Chemistry: X*, 21, 101193. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101193>

Wunderlich, S., & Back, W. (2009). Overview of manufacturing beer: Ingredients, processes, and quality criteria. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 3–16). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00001-8>

Yang, D., & Gao, X. (2021). Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 754–764. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.048>

Yang, L., Lu, Z., Lu, J., & Wu, D. (2023). Evaluation of the antioxidant characteristics of craft beer with green tea. *Journal of Food Science*, 88(2), 625–637. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16441>

Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Gironés-Vilaplana, A., Santos-Lax, D., Noguera-Artiaga, L., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2019). Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *LWT*, 103, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.002>

- Zhang, P., Hai, H., Sun, D., Yuan, W., Liu, W., Ding, R., Teng, M., Ma, L., Tian, J., & Chen, C. (2019). A high throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC Biotechnology*, *19*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0525-7>
- Zhao, H. (2014). Endogenous antioxidants and antioxidant activities of beers. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (pp. 15–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00002-7>
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, *119*, 1150–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>
- Zhao, H., Li, H., Sun, G., Yang, B., & Zhao, M. (2013). Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(4), 910–917. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5824>
- Zhao, X., Yin, Y., Fang, W., & Yang, Z. (2023). What happens when fruit married with beer? *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *32*, 100716. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100716>
- Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X., & Tang, K. (2007). *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, *35*(4), 559–574. <https://doi.org/10.1142/S0192415X07005065>

Apêndice I

Resumo publicado na *Proceedings of Research and Practice in Allied and Environmental Health*



ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



A importância dos probióticos nas cervejas artesanais: revisão narrativa

Diana Santos¹, Maria João Pereira¹, Fernando Moreira², Luísa Barreiros^{1,3}, Ana Isabel Oliveira², Cláudia Pinho²

¹ Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

³ LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

*drdianasantos@gmail.com

Introdução: A cerveja constitui uma bebida funcional dado o seu valor nutritivo e possível enriquecimento com ingredientes inovadores, que lhe confere propriedades nutricionais benéficas para a saúde do consumidor [1,2]. Assim, os probióticos são ingredientes ativos passíveis de serem adicionados, pelas inúmeras vantagens na saúde do hospedeiro [3]. Os alimentos funcionais contendo probióticos são geralmente produtos lácteos. Como tal, a funcionalidade probiótica deve ser confirmada noutros veículos. **Objetivos:** Discutir a viabilidade e os benefícios da incorporação de probióticos em cervejas artesanais. **Metodologia:** Revisão narrativa com pesquisa de artigos na base de dados *PubMed*, utilizando os termos de pesquisa "probiotics", "beer" e "craft beer" combinadas com os operadores booleanos "OR" e "AND". Incluíram-se artigos com referência a benefícios da incorporação de probióticos nas cervejas artesanais, em língua inglesa e portuguesa, não tendo sido estabelecidos limites temporais. **Resultados:** As cervejas artesanais não são filtradas nem pasteurizadas o que lhes confere, genericamente, maior teor de compostos fenólicos totais (TPC) e maior atividade antioxidante [1]. A ausência destas etapas, apesar de fundamentais para a garantia de isenção de contaminações, potencia os benefícios desta cerveja, e a incorporação de probióticos [4]. A incorporação de *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* em co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* na cerveja artesanal, revelou-se promissora e viável, tendo-se atingido um elevado número de células viáveis ($8,0 \times 10^6$ – $7,0 \times 10^7$ células/mL). Denotou-se ainda o aumento da atividade antioxidante e do teor de polifenóis na cerveja [4]. Por sua vez, durante a co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, a bactéria *Lactobacillus paracasei* L26 manteve uma elevada viabilidade ($>10^8$ CFU/mL), evidenciando a boa compatibilidade entre os dois microrganismos [5]. Também a fermentação da cerveja com *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 demonstrou um TPC e atividade antioxidante elevados [6]. **Conclusão:** A incorporação de probióticos nas cervejas artesanais pode ser uma opção promissora na otimização das propriedades antioxidantes e compostos fenólicos, bem como na contribuição para a manutenção da microbiota intestinal.


Palavras-chave: Atividade antioxidante; cerveja artesanal; *Lactobacillus paracasei* L26; probióticos; *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*;

Referências


- [1] Baiano A. Craft beer. An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021; 20:1829-1856.
- [2] Habschied K, Živković A, Krstanović V, Mastanjević K. Functional beer - A review on possibilities. *Beverages* 2020;6.
- [3] Mack DR. Probiotics: Mixed messages. *Canadian Family Physician*. 2005;51(11):1455.
- [4] Capece A, Romaniello R, Pietrafesa A, et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*. 2018; 284:22-30.
- [5] Alcine Chan MZ, Chua JY, Toh M, Liu SQ. Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during cofermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiology*. 2019; 82:541-550.
- [6] Loh LX, Ng DHJ, Toh M, Lu Y, Liu SQ. Targeted and nontargeted metabolomics of amino acids and bioactive metabolites in probiotic-fermented unhopped beers using liquid chromatography high-Resolution mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2021;69(46):14024-14036.

Apêndice II

Poster apresentado nas "I Jornadas do CISA: Jovens com a Ciência"



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE



CISA
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

I Jornadas do CISA: Jovens com a Ciência

A Importância dos Probióticos nas Cervejas Artesanais: Revisão Narrativa


Diana Santos^{1*}; Maria João Pereira¹; Fernando Moreira²; Luísa Barreiros^{1,3}; Ana Isabel Oliveira²; Cláudia Pinho²

¹ Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal, *drdianasantos@gmail.com
² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
³ LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal

INTRODUÇÃO

A cerveja constitui uma bebida funcional dado o seu valor nutritivo e possível enriquecimento com ingredientes inovadores, que lhe confere propriedades nutricionais benéficas para a saúde do consumidor^{1,2}. Assim, os probióticos são ingredientes ativos passíveis de serem adicionados, pelas inúmeras vantagens na saúde do hospedeiro³. Os alimentos funcionais contendo probióticos são geralmente produtos lácteos. Como tal, a funcionalidade probiótica deve ser confirmada noutros veículos.

OBJETIVOS



A presente Revisão Narrativa tem como principal objetivo: Discutir a viabilidade e os benefícios da incorporação de probióticos em cervejas artesanais.

MÉTODOS

- 1 • Base de dados: PubMed
- 2 • Palavras-chave: "probiotics", "beer" e "craft beer"
- 3 • Operadores booleanos: "OR" e "AND"
- 4 • Língua: inglesa e portuguesa
- 5 • Sem limites temporais

RESULTADOS/DISCUSSÃO

- ✓ A incorporação de probióticos na cerveja artesanal é uma mais valia, dado os benefícios que estes revelam ter na saúde do indivíduo (Tabela 1);
- ✓ Há necessidade de otimização dos processos de incorporação dos probióticos na cerveja artesanal, pois temperaturas elevadas, pasteurização e filtração podem comprometer a sua a sua viabilidade e, consequentemente, os seus benefícios;
- ✓ As etapas de pasteurização e filtração estão associadas à diminuição de contaminantes, porém a sua ausência confere, genericamente, maior teor de compostos fenólicos totais e maior atividade antioxidante às cervejas artesanais.

Tabela 1. Resultados dos artigos alvo de análise na presente revisão narrativa.

Referência	Probióticos	Resultado
(Capece et al., 2018)	Co-fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i> com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	✓ Aumento atividade antioxidante; ✓ Aumento do teor de polifenóis; ✓ Número elevado de células viáveis ($8,0 \times 10^9$ - $7,0 \times 10^7$ células/mL); ✓ Não afetou negativamente o aroma da cerveja.
(Loh et al., 2021)	Co-fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WB-06 com <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Lpc-37 (PB); Co-fermentação de <i>S. cerevisiae</i> CNCM I-3856 com <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Lpc-37 (PYPB)	✓ Ambas apresentam aumento dos níveis de teor de compostos fenólicos totais; ✓ Apenas PB apresentou aumento da capacidade antioxidante.
(Aline Chan et al., 2019)	Co-fermentação de <i>Lactobacillus paracasei</i> L26 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S-D4	✓ Elevada estabilidade; ✓ Elevada viabilidade celular ($>10^8$ CFU/mL).
(Silva et al., 2021)	Co-fermentação de <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> DTA 81 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var <i>bouardii</i> 17	✓ Ambos têm potencial efeito antidepressivo; ✓ <i>S. cerevisiae</i> var <i>bouardii</i> 17 apresenta elevada produção de ácido acético, pelo stress celular, conferindo gosto residual.
(Oliveira et al., 2022)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG A-905	✓ Cerveja artesanal não filtrada com probiótico: - Reduziu a mortalidade e a perda de peso de ratos infetados pela bactéria <i>Salmonella Typhimurium</i> ; - Manutenção das propriedades probióticas da levedura; - Efeito protetor pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias e das alterações histopatológicas.
(Ramírez-Cota et al., 2021)	<i>S. cerevisiae</i> vs. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardii</i> CNCM I-745	✓ <i>S. bouardii</i> demonstrou boa tolerância ao etanol, quando cultivada a 28°C; ✓ Incorporação promissora na produção de cerveja artesanal.

CONCLUSÃO

A incorporação de probióticos nas cervejas artesanais pode ser uma opção promissora na otimização das propriedades antioxidantes e compostos fenólicos, bem como na contribuição para a manutenção da microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beano A. Craft beer: An overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2021;20:1828-1896. doi:10.1111/1541-4307.12693 # 2. Hrabčević K, Žilović A, Kraljević V, Mesterjanić K. Functional beer - A review on possibilities. *Beverages* 2020;6. doi:10.3390/beverages6020051 # 3. Mack DR. Probiotic: Mixed messages. *Can Fam Physician* 2020;51(11):1459-1464. # 4. Capone A, Romanillo R, Pietrekas A, Smeto G, Pietrekas R, Zambola M, & Romano P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* in co-fermentation with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, 264, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028> # 5. Loh, L. X., Ng, D. H. J., Tan, M., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2021). Targeted and nontargeted metabolomics of amino acids and bioactive metabolites in probiotic-fermented untopped beer using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(46), 14024-14036. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03992> # 6. Aline Chan, M. Z., Chua, J. Y., Toh, M., & Liu, S. Q. (2019). Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiology*, 82, 541-550. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.001> # 7. Silva, L. C., de Souza Lago, H., Rocha, M. O. T., de Oliveira, V. S., Leuciano-Melo, R., Stutz, E. T. G., de Paula, S. P., Medeiros, J. F. R., Luchini, R. H., Guarna, A. F., & Rodrigues, P. (2021). Craft beers fermented by potential probiotic yeast or lactobacilli show promise antidepressant-like behavior in wistar wistar mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 698-708. <https://doi.org/10.1007/s12089-020-00735-8> # 8. Beena, S. H. M., Campos, L. L., Amaral, M. N. S., Galati, S., Ricci, M. F., Visei, K. D., Souza, R. O., Uetanabaro, A. P. T., Junqueira, M. S., Silva, A. M., Fernandes, S. O. A., Cardoso, V. N., Nicolli, J. R., & Martins, F. S. (2022). Evaluation of a functional craft wheat beer fermented with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 to treat *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12082-022-00973-z> # 9. Ramirez-Cota, G. Y., López-Villegas, E. O., Jiménez-Aparicio, A. R., & Hernández-Sánchez, H. (2021). Modeling the ethanol tolerance of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* CNCM I-745 for its possible use in a functional beer. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(1), 187-194. <https://doi.org/10.1007/s12082-020-0980-5>

Apêndice III

Resumo publicado na *Proceedings of Research and Practice in Allied and Environmental Health*

PROCEEDINGS

Potenciais efeitos benéficos do xanthohumol no fígado

Diana Santos ^{1*}, Ana Isabel Oliveira ^{1,2}, Cláudia Pinho ^{1,2}

¹ Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal

* drianasantos@gmail.com

Enquadramento: O fígado é o principal local de metabolização do álcool presente na cerveja, pelo que é particularmente suscetível a lesões provocadas pelos subprodutos resultantes desse processo. Contudo, a cerveja possui na sua constituição compostos com propriedades benéficas à saúde, como é o caso do xanthohumol, que é um dos principais flavonoides presente nas inflorescências do lúpulo (*Humulus lupulus*) [1]. Desta forma, este composto fitoquímico tem particular interesse dado os seus potenciais benefícios a nível hepático. **Objetivo:** Discutir os efeitos fisiológicos do xanthohumol a nível hepático, em estudos *in vitro* e *in vivo*. **Métodos:** Revisão narrativa com pesquisa de artigos na base de dados *PubMed*, utilizando os termos de pesquisa "Xanthohumol", "liver", "hepatic", "beer" e "craft beer" combinadas com os operadores booleanos "OR" e "AND". Incluíram-se artigos com referência aos efeitos do xanthohumol no fígado, em língua inglesa e portuguesa, não tendo sido estabelecidos limites temporais. **Resultados:** O xanthohumol presente nas cervejas revelou ser promissor a nível hepático, em estudos *in vitro* e *in vivo* em ratos. Num estudo *in vitro* o xanthohumol revelou possuir capacidade anticancerígena, dado inibir a ativação das células estreladas hepáticas e induzir a sua apoptose [2]. Por sua vez, em estudos *in vivo* em ratos o xanthohumol revelou ter propriedades anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias, uma vez que demonstrou capacidade de prevenir a formação e expansão clonal de focos pré-neoplásicos no fígado, inibir a indução de dano ao ADN (ácido desoxirribonucleico), inibir a peroxidação lipídica, proteger contra a degradação de enzimas antioxidantes, bem como reduzir a inflamação hepática e a expressão de genes pró-fibrogénicos [1-3]. **Conclusões:** O xanthohumol demonstrou ter propriedades hepatoprotetoras, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Contudo, são necessários ensaios clínicos em humanos, a fim de serem confirmados os efeitos benéficos do xanthohumol no fígado e serem determinadas as doses adequadas para consumo humano.

Palavras-chave: Cerveja; fígado; xanthohumol;

Reconhecimentos

Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Referências


[1] Pinto, C; Duque, AL; Rodríguez-Galdón, B; Cestero, JJ; Macías P. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2012, 50, 3405–12.

[2] Dorn, C; Kraus, B; Motyl, M; Weiss, TS; Gehrig, M; Schölmerich, J; et al. Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Mol Nutr Food Res* 2010, 54, 205–13.

[3] Ferk, F; Huber, WW; Filipič, M; Bichler, J; Haslinger, E; Mišik, M; et al. Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 2010, 691(1–2), 17–22.

Apêndice IV

Poster apresentado no "XI Congresso da Associação Portuguesa de Licenciados em Farmácia – A nova geração na vanguarda da inovação"




APLF
ASSOCIAÇÃO
PORTUGUESA DE
LICENCIADOS EM
FARMÁCIA

21
OUTUBRO '23

A NOVA GERAÇÃO NA VANGUARDA DA INOVAÇÃO

CONGRESSO NACIONAL

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE POLITÉCNICO DO PORTO



CISA
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO
EM SAÚDE E AMBIENTE

P.PORTO
ESCOLA SUPERIOR
DE SAÚDE

Potenciais Efeitos Benéficos do Xanthohumol no Fígado


Santos, Diana¹; Oliveira, Ana Isabel²; Pinho, Cláudia²

¹Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
²Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
*drdianasantos@gmail.com

INTRODUÇÃO

O fígado é o principal local de metabolização do álcool presente na cerveja, pelo que é particularmente suscetível a lesões provocadas pelos subprodutos resultantes desse processo¹. Contudo, a cerveja artesanal possui na sua constituição compostos com propriedades benéficas à saúde, como é o caso do xanthohumol². O xanthohumol é um dos principais flavonoides presentes nas inflorescências do lúpulo (*Humulus lupulus* L.), que é amplamente utilizado na produção de cerveja para conferir sabor e aroma à mesma³. Desta forma, este composto fitoquímico tem particular interesse devido aos seus potenciais benefícios a nível hepático.

OBJETIVOS



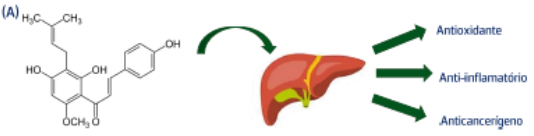
A presente Revisão Narrativa tem como principal objetivo:
Discutir os potenciais efeitos benéficos do Xanthohumol a nível hepático, em estudos *in vitro* e *in vivo*.

MÉTODOS

- 1 - Base de dados: PubMed
- 2 - Palavras-chave: "xanthohumol", "liver", "hepatic", "beer" e "craft beer"
- 3 - Operadores booleanos: "AND" e "OR"
- 4 - Língua: inglesa e portuguesa
- 5 - Sem limites temporais

RESULTADOS/DISCUSSÃO

✓ O xanthohumol é um composto fenólico presente na cerveja, mais concretamente um prenilflavonoide derivado do lúpulo (Figura 1). A sua capacidade de eliminar radicais livres é comparável à das catequinas presentes no chá verde, sendo ainda várias vezes mais forte que a atividade das vitaminas C e E. O composto apresenta muitas propriedades benéficas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antibacterianas, antitumorais, anti-ateroscleróticas, antimutagénicas, antioxidantes e hepatoprotetoras. Uma fonte deste composto na dieta humana é a cerveja. Porém, seu conteúdo é baixo, chegando a cerca de 0,1 mg/L de cerveja.



- ✓ A presença de xanthohumol na cerveja artesanal é promissora, dado as propriedades hepatoprotetoras que este revela (Tabela 1).
- ✓ Sabe-se que cervejas mais escuras têm um maior teor de xanthohumol face às cervejas mais claras;
- ✓ Habitualmente, o teor médio de xanthohumol na cerveja não é o suficiente para produzir um efeito protetor³. Contudo, já é possível:
 - Produzir cervejas enriquecidas com xanthohumol, até 20mg/L⁴;
 - O xanthohumol ser isolado do lúpulo em grandes quantidades e ser usado como suplemento dietético para prevenção e tratamento de patologias hepáticas³.

Tabela 1. Resultados dos artigos alvo de análise na presente revisão narrativa.

REFERÊNCIA	TIPO DE ENSAIO	RESULTADOS
(Ferket al., 2010)	<i>In vivo</i> (ratos)	Prevenção da formação e expansão clonal de focos pré-neoplásicos no fígado; Inibição da indução de dano ao ADN (ácido desoxirribonucleico) no tecido hepático.
(Dorn, Kraus, et al., 2010)	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> (ratos)	Inibição da ativação das células estreladas hepáticas e indução da sua apoptose, <i>in vitro</i> ; Redução da inflamação hepática e a expressão de genes pró-fibrogénicos, <i>in vivo</i>
(Zhang et al., 2022)	<i>In vitro</i>	Apoptose com alguma necrose de células HepG2.
(Pinto et al., 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Efeito antioxidante; Inibição da peroxidação lipídica; Proteção contra a degradação de enzimas antioxidantes.
(Piazar et al., 2007)	<i>In vitro</i>	Proteção das células do carcinoma hepatocelular humano contra a genotoxicidade induzida por agentes genotóxicos.
(Miranda et al., 2000)	<i>In vitro</i>	Indução da quinona redutase (composto com potenciais propriedades anticancerígenas).
(Kunnimalaiyaan et al., 2015)	<i>In vitro</i>	Inibição da via de sinalização Notche; consequente, supressão do crescimento células do carcinoma hepatocelular; Aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas.
(Dorn, Weiss, et al., 2010)	<i>In vitro</i>	Inibição da expressão de Interleucina-8; Inibição da proliferação e da migração de células de carcinoma hepatocelular.
(Pinto et al., 2014)	<i>In vivo</i> (ratos)	Proteção contra danos oxidativos agudos induzidos pelo álcool; Efeito antioxidante.

CONCLUSÃO


O xanthohumol revela possuir potenciais propriedades hepatoprotetoras, nomeadamente, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Contudo, são necessários ensaios clínicos em humanos, a fim de serem confirmados os efeitos benéficos do xanthohumol no fígado e serem determinadas as doses adequadas para consumo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hyun J, Han J, Lee C, Yoon M, Jung Y. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *Int J Mol Sci* 2021;22: doi:10.3390/ijms22155717 // 2. Pinto C, Duque AL, Rodrigues-Galdino B, Cestaro J, Macias P. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food Chem Toxicol* 2012;50:3425-3432. doi:10.1016/j.fct.2012.07.035 // 3. Dorn C, Kraus B, Meyer M, et al. Xanthohumol, achalcone derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Mol Nutr Food Res* 2010;54:205-213. doi:10.1002/mnfr.200900374 // 4. Munderlich S, Zurcher A, Beck W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:874-881. doi:10.1002/mnfr.200500051 // 5. Ferket F, Huber WW, Fiksel M, et al. Xanthohumol, aprenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 2010;691(2):17-22. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.06.006 // 6. Zhang X, Wang T, Zhou H, Li Y, Guo H, Su H. Differential Inhibitory Effect of Xanthohumol on HepG2 Cells and Primary Hepatocytes. *Dose-Response* 2022;20(4):1-7. doi:10.1177/15593258221136033 // 7. Piazar J, Li J, Li Y, et al. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo[a]pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butylhydroperoxide (tBHP) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutat Res* 2007;632:1-8. doi:10.1016/j.mrgtox.2007.03.013 // 8. Miranda CL, Agosti GM, Stevens JF, Diezner ML, Sulber DB. Phenylated chalcones and flavones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett* 2000;151:23-29. doi:10.1016/S0304-3835(99)00338-8 // 9. Kunnimalaiyaan S, Sokolowski KM, Batamuruga M, Clark Gambito T, Kunnimalaiyaan M. Xanthohumol inhibits Notch signaling and induces apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0127464 // 10. Dorn C, Weiss TS, Hellmann J, Hellerbrand C. Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010;36:435-441. doi:10.3892/ijo.00000517 // 11. Pinto C, Cestaro J, Rodrigues-Galdino B, Macias P. Xanthohumol, aprenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.) protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicol Reports* 2014;1:726-733. doi:10.1016/j.toxrep.2014.09.004

Apêndice V

Poster apresentado no “XIX Colóquio de Farmácia – Saúde mental: Desafios, abordagens terapêuticas e perspetivas atuais”



CISA
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Contaminantes microbiológicos da cerveja artesanal: Revisão narrativa

P.PORTO ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Santos, Diana^{1*}; Barreiros, Luisa^{1,2}; Oliveira, Ana Isabel^{1,3,4}; Pinho, Cláudia^{1,3}


¹Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
²LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal
³Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
⁴Laboratório de Química Verde (LAQV)/REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
*drs@ess.ipp.pt

INTRODUÇÃO

A autenticidade, inovação e qualidade associadas às cervejas artesanais têm contribuído para o aumento da produção e consumo desta bebida. O facto da cerveja artesanal não ser, habitualmente, uma bebida pasteurizada ou filtrada, contribui para a ocorrência de contaminações, nomeadamente, contaminações microbiológicas, nas quais bactérias e leveduras podem produzir alterações sensoriais, microbiológicas, químicas, e físicas no produto. As contaminações microbiológicas podem comprometer a qualidade do produto final e a saúde do consumidor e, como tal, o conhecimento da presença dos diferentes tipos de contaminantes na cerveja pode ajudar a aplicar diferentes estratégias para o seu controlo e diminuição dos efeitos nocivos (1,2).

OBJETIVOS

MÉTODOS



A presente Revisão Narrativa tem como objetivo principal: Identificar os principais contaminantes microbiológicos e discutir o seu impacto na cerveja artesanal.

- 1 • Base de dados: *PubMed* e *B-on*
- 2 • Palavras-chave: “microbiological”, “contamination”, “spoilage” e “craft beer”
- 3 • Operadores booleanos: “AND” e “OR”
- 4 • Língua: inglesa, espanhola e portuguesa
- 5 • Sem limites temporais

RESULTADOS/DISCUSSÃO

✓ A cerveja é geralmente um ambiente hostil ao crescimento microbiano devido à presença de etanol (0,5–10%, v/v), pH baixo (aproximadamente 3,9–4,4), de compostos amargos do lúpulo, elevado teor de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5%, p/p), baixo teor de oxigénio (0,1 ppm) e ausência de substâncias nutritivas (1). Porém, existem bactérias e leveduras que têm a capacidade de sobreviver e crescer nestas condições, comprometendo a qualidade da cerveja.

✓ Os contaminantes microbianos podem provir de (3):



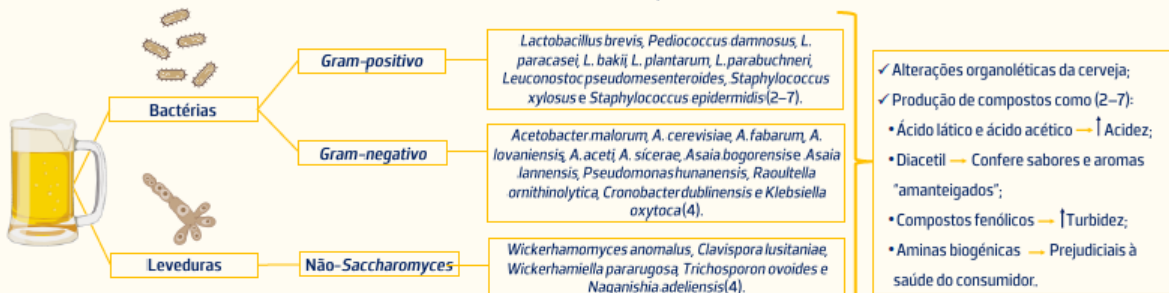
Matérias-primas



Equipamentos e meio envolvente ao processo de fabrico



Equipamentos e materiais utilizados no acondicionamento



Bactérias

- Gram-positivo**: *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *L. paracasei*, *L. baki*, *L. plantarum*, *L. parabuchneri*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus epidermidis* (2–7).
- Gram-negativo**: *Acetobacter malorum*, *A. cerevisiae*, *A. fabarum*, *A. lovaniensis*, *A. acetii*, *A. sicerae*, *Asaia bogorensis*, *Asaia lannensis*, *Pseudomonas humanensis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Cronobacter dublinensis* e *Klebsiella oxytoca* (4).

Leveduras

- Não-Saccharomyces**: *Wickerhamomyces anomalus*, *Clavispora lusitanae*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Trichosporon ovoides* e *Naganishia adeliensis* (4).

✓ Alterações organolépticas da cerveja;
✓ Produção de compostos como (2–7):
• Ácido láctico e ácido acético → ↑ Acidez;
• Diacetil → Confere sabores e aromas “amanteigados”;
• Compostos fenólicos → ↑ Turbidez;
• Aminas biogénicas → Prejudiciais à saúde do consumidor.

Figura 1 – Contaminantes microbiológicos da cerveja artesanal e o seu impacto na cerveja.

CONCLUSÃO


As fontes de contaminantes podem ter origem nas matérias-primas, nos equipamentos ou durante o processo de produção. Para evitar contaminações microbiológicas é fundamental adotar boas práticas de produção, nomeadamente, uma correta higienização, e utilizar matérias-primas de elevada qualidade. Desta forma, obtêm-se cervejas artesanais de qualidade e que atendem à demanda do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Menz G, Aldred P, Vriesekoop F. Pathogens in Beer: Em Beer in Health and Disease Prevention [Internet]. Victor R, Prody, Elsevier; 2009. pp.403–13. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123738912000390> // 2. Yu Z, Fu W, Yu Y, Tang W, Li R, Li X. The biogenic amine-producing bacteria from craft beer and their kinetic analysis between growth characteristics and biogenic amine formation in beer. *Journal of Food Science*. 2021;96(11):4991–5003. // 3. Menz G, Andrighetto C, Lombardi A, Corich V, Aldred P, Vriesekoop F. Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*. 2010;116(1):14–22. // 4. Latorre M, Bruzone MC, De Garcia V, Libkind D. Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2023;59(1):88–99. // 5. Poveda JM, Ruiz P, Seseña S, Palop ML. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during craft brewing process. *LWT – Food Science and Technology*. 2017;85:129–36. // 6. Rodríguez-Saavedra M, González-De Llano D, Moreno-Arribas MV. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota. *Microbiological quality and food safety*. *Food Research International*. 2020;138:109762. // 7. Yu Z, Luo Q, Xiao L, Sun Y, Li R, Sun Z, et al. Beer-spoilage characteristics of *Staphylococcus xylosum* newly isolated from craft beer and its potential to influence beer quality. *Food Science & Nutrition*. 2019;7(12):3950–7.

Apêndice VI

Poster apresentado no "XIX Colóquio de Farmácia – Saúde mental: Desafios, abordagens terapêuticas e perspetivas atuais"



CERVEJAS ARTESANAIS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE



Diana Santos¹; Maria João Pereira¹; Ana Isabel Oliveira^{1,2,3}; Cláudia Pinho^{1,2}

¹ Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
² Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
³ Laboratório de Química Verde (LAQV)/REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, R. Dr. António Bernardino de Almeida 400, 4200-072 Porto, Portugal
 drs@ess.ip.pt


INTRODUÇÃO

A cerveja artesanal é composta por quatro ingredientes base, ou seja, água, malte, lúpulo e leveduras. Esta é uma matriz rica em compostos antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos, flavonoides, flavanonas e os derivados dos floroglucínios, o que releva o interesse do seu estudo dada a escassez de evidências científicas^{1,2,3}. Deste modo, surge a possibilidade de correlacionar uma bebida alcoólica a benefícios para a saúde.

RESULTADOS/ DISCUSSÃO

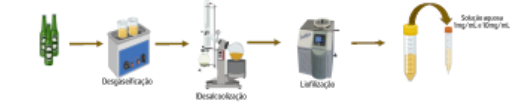
- ✓ Quanto aos açúcares redutores (Tabela 1), o TAR varia entre 1,36–4,75 g (por garrafa de 0,33L, sendo os valores superiores aos mencionados por Silva *et al.*, (2022) (0,857 a 1,467g por 0,33L), podendo ser justificado pela utilização de diferentes cervejas. O TAR varia entre estilos de cervejas artesanais, o que influencia o processo de fermentação da cerveja⁴.
- ✓ O TCF variou entre 4,07 e 8,15 mg GAE/g, em que as cervejas Stout (ESF-IS e EL-MS) demonstraram maiores teores, porém, próximos às cervejas claras. A literatura não é consistente na correlação entre o TCF e a coloração da cerveja. Nos estudos de Censi *et al.*, (2021) e Silva *et al.*, (2022) as cervejas escuras (ex: Estilo Stout) contém um maior TCF, enquanto no estudo de Breda *et al.*, (2022) verifica-se um maior TCF em cervejas claras.

OBJETIVOS


 Avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante de extratos aquosos de cervejas artesanais.

MÉTODOS

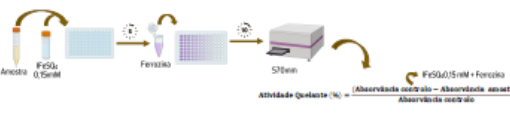
1. Obtenção e tratamento das cervejas artesanais




2. Ensaio do teor de açúcares redutores (TAR)




3. Ensaio da atividade quelante de metais (ferrozina)



4. Ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)



5. Teor de compostos fenólicos totais (TCF)




✓ Os compostos antioxidantes caracterizam-se pela capacidade de prevenir ou retardar a oxidação, através da inibição de enzimas oxidantes, pela quelação de íons metálicos e neutralização de radicais livres pela doação de átomos de hidrogénio ou de eletrões^{5,6}.

✓ No ensaio da ferrozina as percentagens de inibição variaram entre 21,96 ± 2,03 (ESF-IS) e 41,60 ± 0,28 (EL-IPA), sendo estas percentagens dependentes da concentração.

✓ O ensaio FRAP mede o potencial antioxidante em amostras através da redução do ferro férrico (Fe³⁺) a ferro ferroso (Fe²⁺) pelos antioxidantes presentes. Os valores variaram entre 162,07 ± 1,33 µMol TE/10mg (EPT-DB) e 309,40 ± 0,00 µMol TE/10mg (EL-IPA) (Tabela 2).

✓ Os resultados observados, em particular para a cerveja EL-IPA, podem advir da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nas cerveja.



India Pale Ale → Cerveja com > Atividade quelante
Cerveja com > valor de FRAP
3^o Melhor TCF

✓ Compostos fenólicos como o ácido gálico, galocatequina, catequina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, luteolina, epicatequina, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina e ácido trans-cinâmico já foram detetados em cervejas artesanais⁷.

CONCLUSÃO

Em suma, as amostras em estudo revelam um poder antioxidante promissor. No entanto, outros ensaios antioxidantes devem ser realizados com o intuito de se averiguar outros mecanismos antioxidantes. Além disso, o tamanho amostral deve ser aumentado afim de se obter resultados mais robustos para cada estilo de cervejas artesanais.

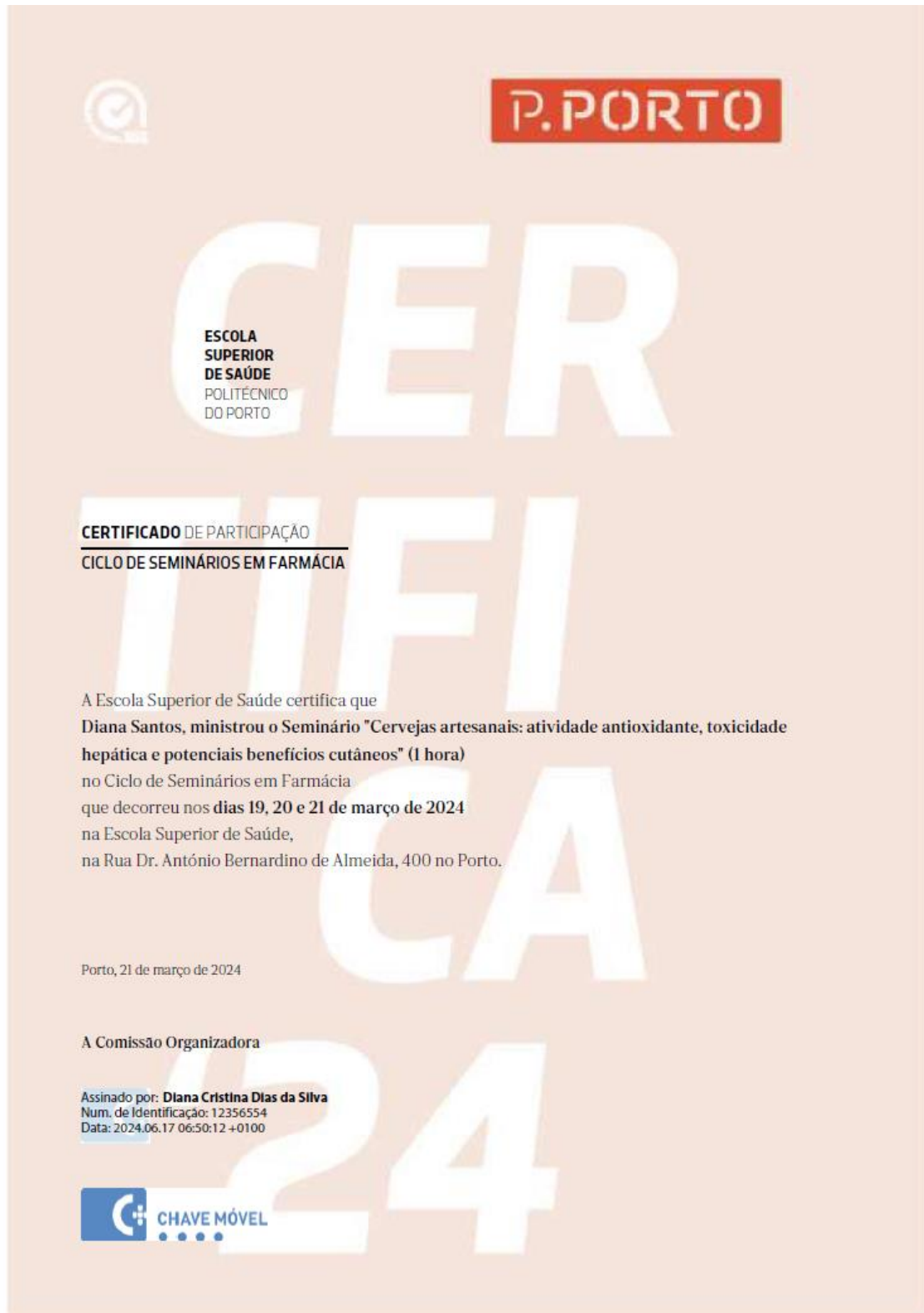
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Ceresir, Virginia Peregino D, Gaglianico MR, Lupat G, Argenteo C, Pizzicelli, *et al.* New Antioxidant Ingredients from Brewery By-Products for Cosmetic Formulations. *Cosmetics* 2021;9(6):916. // 25 Ana S. Oliveira A, Cruz A, Oliveira R, Almeida R, Pinho C. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Portuguese Craft Beers and Raw Materials. *Materials* 2022;15(2):807. // 3 Chen, W, Becker, T, Qian, F, & Peng, J. (2018). Beer and beer compounds: Physiological effects on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(14):2519. // 4 Zhang, P, Hai, H, Sun, D, Yuan, W, Lu, W, Ding, R, Teng, M, Ma, L, Tian, L, & Chen, C. (2018). A high-throughput method for total alcohol determination in fermentation broths. *BMC Biotechnology*, 1-8. // 5 Alia LM, Mohamed NH, Abdelgawad AAM. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Nat Synth antioxidants* 2017;6(3):65-75. // 6 Baek, J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep* 2016;21(6):164-9. // 7 Breda C, Barros AJ, Guimarães L. Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *Int J Gastron Food Sci* 2022;27.

132

Apêndice VII

Palestrante no seminário "Cervejas artesanais: atividade antioxidante, toxicidade hepática e potenciais benefícios cutâneos"



Apêndice VIII

Resumo publicado na "Scientific LettersCESPU"



Poster 34

Potential impact of packaging type material in beer quality

Diana Santos ^{1,2}, Maria João Pereira ¹, Ana Isabel Oliveira ^{1,2} and Cláudia Pinho ^{1,2}

¹ ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal

² REQUIMTE/LAQV, ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal

* Correspondence: drs@ess.ipp.pt

<https://doi.org/10.48797/sl.2024.247>

Abstract

Background: The materials in which beverages are packed are crucial to maintain quality, nutritional properties, and safety of the final product. In what beer concerns, and even under optimal storage conditions, its quality deteriorates as the product approaches the expiration date, regardless of the container type in which it is packed [1]. Therefore, a careful selection of packaging is imperative to maintain beer's integrity and quality, when tasted by the consumer. **Objective:** This work aims to discuss how the type of beer packaging influences the integrity and quality of this beverage during storage. **Methods:** A literature review was performed, using PubMed, b-on, and Web of Science databases. Articles related to the influence of packaging types on beer quality, in English, and published in the last 5 years were included. **Results:** Plastic bottles (PB) proved to be the least suitable type of packaging for long-term storage, as beer exhibits significant changes in volatile compounds, turbidity, color, bitterness intensity, and decrease in CO₂ content, unlike glass bottles (GB), aluminum cans (AC), and stainless steel kegs (KG), where these parameters remain constant [1-3]. Furthermore, Brown GB proved to be a more effective barrier against light compared to green GB and PB, as well as containing lower amounts of phthalates than beers in PB and AC [4,5]. AC was capable of retaining all organoleptic characteristics, showing a slight increase in bitterness after 10 months of storage [1]. However, beers stored in AC were characterized by higher aluminum contents compared to the products stored in glass bottles [6]. **Conclusions:** The beer packaging material plays a crucial role in its quality. Thus, GB, AC and KG, due to their barrier characteristics and protection against external factors, generally outperform PB in preserving the integrity and quality of beer.

Keywords: beer; packaging material; quality

Acknowledgments

This research received no external funding

References

1. Lorençová, E.; Salek, R.N.; Černošková, I.; Buňka, F. Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control* (2019), 106, 106706.
2. Gagula, G.; Sanić, G.; Rezić, T.; Horvat, D.; Magdić, D. Changes in the Physicochemical Properties of Pale Lager Beer during Storage in Different Packaging Materials. *J Am Soc Brew Chem* (2023), 81(2), 351-356.
3. Gagula, G.; Mastanjević, K.; Mastanjević, K.; Krstanović, V.; Horvat, D.; Magdić, D. The influence of packaging material on volatile compounds of pale lager beer. *Food Packag. Shelf Life* (2020), 24, 100496.
4. Gabriel, P.; Dienstbier, M.; Fous, K.; Matoušková, D. Characterization of packaging ability to protect beer from light degradation and introduction of a new Packaging Riboflavin Index. *Kvasný Průmysl* (2022), 68(5), 679-685.
5. Häbschried, K.; Kartalović, B.; Lazić, D.; Krstanović, V.; Mastanjević, K. Survey on phthalates in beer packaged in aluminum cans, PET and glass bottles. *Fermentation* (2023), 9(2), 125.
6. Gajek, M.; Wysocki, P.; Pawlaczek, A.; Sać, L.; Szykowska-Jóźwik, M.I. The Elemental Profile of Beer Available on Polish Market: Analysis of the Potential Impact of Type of Packaging Material and Risk Assessment of Consumption. *Molecules* (2022), 27(9), 2962.

Apêndice X

Resumo publicado na "Scientific Letters CESPÚ



III 1H-TOXRUN INTERNATIONAL CONGRESS 2024

P 35

Poster 35

Antioxidant profile of Portuguese and Spanish craft beers

Maria João Pereira ^{1,*}, Diana Santos ¹, Cláudia Pinho ² and Ana Isabel Oliveira ²

¹ ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4200 - 072, Porto, Portugal

² LAQV/ REQUIMTE, ESS, Polytechnic of Porto, Rua Dr. Antonio Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal

* Correspondence: psj@ess.ipp.pt

<https://doi.org/10.48797/sl.2024.246>

Abstract

Background: The antioxidant potential of craft beer (CB) may be due to high quality of the raw materials (water, malt, hop and yeast) and traditional techniques [1-4]. The scarcity of studies evaluating the antioxidant potential of CB highlights the relevance of this study. **Objective:** *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of aqueous extracts of Portuguese and Spanish CB. **Methods:** Experimental study using six CB with different styles: Milk Stout (EL-MS), India Pale Ale (EL-IPA, ALM-IPA), Imperial Stout (EME-IS), Oatmeal Stout (ALM-OS), Pilsner (EL-P), Munich Dunkel (B-MD) and two industrial beers, Pilsner (S-P) and Munich Dunkel (S-MD). The pH, acidity content (AC) and total phenolic compounds (TPC) were determined. The antioxidant capacity was assessed using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and the hydrogen peroxide (H₂O₂) assays, expressed in concentration for 50% activity inhibition (IC₅₀). One-way ANOVA and Student's t-test were used for statistical analysis in GraphPad[®] Prism 8.0 software, with a significance level of 0.05. **Results:** The pH of the beers varied between 3.89±0.00-4.78±0.05 and AC between 0.13±0.01-0.44±0.01%. ALM-IPA had the highest TPC value (8.96±0.64mg gallic acid equivalents/g). IPA style presented the lower IC₅₀ values in H₂O₂ (ALM-IPA with an IC₅₀=23.54±1.53µg/mL, *p*<0.05) and ABTS (EL-IPA with an IC₅₀=55.21±4.68µg/mL, *p*<0.05) assays. The industrial beers have lower TPC values compared to CB (same style, *p*<0.05), and lower capacity to neutralize the H₂O₂ and ABTS radicals. For Omisore *et al.* (2005), samples with IC₅₀>50µg/mL are classified as being moderately active, while samples with IC₅₀<50µg/mL have high antioxidant capacity. Also, the results for IPA style are in line with Breda *et al.* (2022), in which light-colored beers had better antioxidant profiles. However, according to Silva *et al.* (2022) the best antioxidant profiles were associated with dark beers. **Conclusions:** The samples showed antioxidant potential, but further tests should be carried out considering the complex underlying antioxidant mechanisms.

Keywords: craft beer; antioxidant activity; phenolic compounds

Acknowledgments


This research received no external funding.


References


1. DRE. Portaria n.º 91/2022 de 9 de fevereiro. Diário da República (2022). 1ª Série, 4-7.
2. Villacreses, S.; Blanco, C.A.; Caballero, I. Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Biosci* (2022), 45, 1-17.
3. Silva, S.; Oliveira, A.; Cruz, A.; Oliveira, R.; Almeida, R.; Pinho, C. Physicochemical properties and antioxidant activity Portuguese craft beers and raw materials. *Molecules* (2022), 27, 1-15.
4. Breda, C.; Barros, A.I.; Gouveias, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *Int J Gastron Food Sci* (2022), 27, 1-7.
5. Omisore, N.O.A.; Adewunmi, C.O.; Iwalewa, E.O.; Ngadiji, B.T.; Adenowo, T.K.; Abegaz, B.M.; Ojewole, J.A.; Watchueng, J. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barkeri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian J Med Biol Res* (2005), 38, 1087-1094.


Apêndice XI

Poster apresentado no "III 1H-TOXRUN International Congress – The big challenges of the 21st century"









Antioxidant Profile of Portuguese and Spanish Craft Beers

Maria João Pereira¹; Diana Santos¹; Cláudia Pinho²; Ana Isabel Oliveira²

¹ ESS, Polytechnic of Porto, rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal
² LAQV/ REQUIMTE, ESS, Polytechnic of Porto, rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal
*psj@ess.ipp.pt

Introduction


A craft beer is a functional beverage, which results from the alcoholic fermentation from a mixture of malt, water and hops, using traditional techniques [1,2]. The high quality of the raw materials, as well as the absence of pasteurization and filtration processes, generally result in a higher content of total phenolic compounds and antioxidant activity [3,4]. The scarcity of studies evaluating the antioxidant potential of craft beer extracts highlights the relevance of this study.

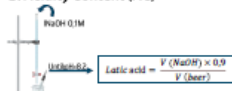
Aim

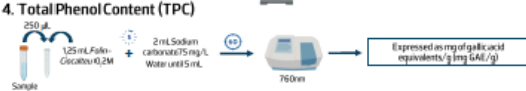
In vitro evaluation of the antioxidant activity of aqueous extracts of Portuguese and Spanish craft beers.


Methods

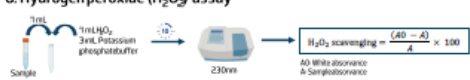
1. Obtaining and processing beers


2. pH determination
3. Acidity Content (AC)


4. Total Phenol Content (TPC)


5. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay


6. Hydrogen peroxide (H₂O₂) assay


7. Statistical analysis

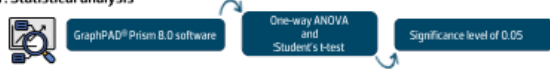



Table 1 - Chemical characteristics of the beers under study.

Type	Style	Code	Source	Craft or industrial	pH	AC (%)
Ale	Milk Stout	EL-MS	Spanish	Craft	4.51±0.01	0.25±0.02
	Imperial Stout	EME-IS	Spanish	Craft	4.39±0.01	0.28±0.00
India Pale Ale	Oatmeal Stout	ALM-OS	Portuguese	Craft	4.49±0.01	0.44±0.01
	India Pale Ale	EL-IPA	Spanish	Craft	4.63±0.00	0.33±0.00
Lager		ALM-IPA	Portuguese	Craft	4.69±0.03	0.18±0.00
	Pilsner	S-P	Portuguese	Industrial	4.43±0.01	0.13±0.01
	Munchen	EL-P	Spanish	Craft	4.74±0.01	0.19±0.01
	Dunkell	B-MD	Portuguese	Craft	4.78±0.05	0.37±0.00

✓ TPC values ranged from 4.62–8.96 mg GAE/g (Table 2). These results are similar to Censi *et al.*, (2021) in which TPC of the studied samples ranged from 18.96 – 30.93 mg GAE/g [6].




↑ TPC value (ALM-IPA);

↓ IC₅₀ values in ABTS assay (EL-IPA, *p* < 0.05);

↓ IC₅₀ values in H₂O₂ assay (ALM-IPA, *p* < 0.05).

The results for IPA style are in line with Breda *et al.*, (2022), in which light-colored beers had better antioxidant profiles. However, according to Silva *et al.*, (2022) the best antioxidant profiles were associated with dark beers [3,4].



↓ TPC values compared to craft beer (same style, *p* < 0.05);

↓ Capacity to neutralize the ABTS and H₂O₂ radicals.

✓ For Omisore *et al.*, (2005), samples with IC₅₀ < 50 µg/mL have high antioxidant capacity, while samples with IC₅₀ > 50 µg/mL are classified as being moderately active [7].

Table 2 – TPC and antioxidant capacity according to the ABTS and H₂O₂ assays.

Code	TPC (mg GAE/g)	ABTS (IC ₅₀ µg/mL)	H ₂ O ₂ (IC ₅₀ µg/mL)
EL-MS	7.95±0.69 ^a	74.20±4.37 ^{a1}	33.79±0.82
EME-IS	4.62±0.16 ^a	108.98±5.44 ^{a2}	36.04±2.57
ALM-OS	7.24±0.40	87.94±3.82 ^{a3}	34.28±2.24
EL-IPA	7.32±0.48 ^b	55.21±4.68 ^b	31.60±1.05 ^b
ALM-IPA	8.96±0.64 ^b	83.27±0.27 ^b	23.54±1.53 ^b
S-P	5.17±0.08 ^b	114.56±5.47 ^b	50.92±3.24 ^b
EL-P	6.68±0.00 ^c	84.30±4.27 ^b	40.92±1.34 ^c
S-MD	6.29±0.08 ^c	123.85±6.87 ^b	50.65±5.04 ^c
B-MD	8.06±0.56 ^d	80.66±4.17 ^b	37.82±1.23 ^c

Different letters indicates statistically significant differences (*p*-value < 0.05) between the beers of each style.

Results/Discussion

- ✓ Beer's pH varied between 3.89 – 4.78, where S-MD presented the lowest value and B-MD the highest pH value (Table 1).
- ✓ The AC varied between 0.13 – 0.44%, where S-P presented the lowest value AC and ALM-OS the highest AC value (Table 1).
- ✓ The results are in accordance with Silva *et al.*, (2022) in which the pH values of the studied samples ranged from 4.27 – 4.92 and AC values from 0.10 – 0.62% [3].

pH and acidity are crucial factors in brewing because they influence the quality of the beer in sensory parameters and guarantee biological and chemical stability.
The brewing industry considers that pH should vary between 3.90 – 4.20 [5].

Conclusion

The samples showed antioxidant potential, but further tests should be carried out considering the complex underlying antioxidant mechanisms.

References

1.ORE, Parteiro, 9/2022 del defensorio Diálogo Republica, 15/6/2022, 4-7 // 2. Vilas Boas, S. Barros, CA, Galabru, L. Desenvolvimento e caracterização de processos de produção de cervejas artesanais. Food Biosci. 2022;451-112 // 3. Silva, S. Oliveira, A. Cruz, A. Oliveira, R. Almeida, R. Pinho, C. Physicochemical properties and antioxidant activity of Portuguese craft beers and raw materials. Molecules. 2022;27(1)-15 // 4. Breda, Barros, A. J. G. et al. Characterization of reactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. Int J Gastric Food Sci. 2022;27(1)-7 // 5. Paiva, T., Sampaio, A. G. et al. Characterization of Portuguese craft beers chemical composition and antioxidant potential. J Food Sci Technol. 2015;52(6) // 6. Censi, R., Paragino, D., Gigliobacco, R., Proccacci, L., Tarozzi, A., Marino, P. D., et al. New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. Cosmetics. 2021;9(9) // 7. Omisore, N. O., Adewumi, C. O., Iweke, E. O., Ngaju, B. T., Adeneye, T. K., Abegbo, B. M., et al. Antioxidant and antibacterial activities of Derlinia bartonii and Derlinia acaciensis. Brazilian Journal of Biotechnology. 2005;38(10):1054 // 8. Breda, O. et al. Beer and Pilsener

137

Protocolos experimentais

Acidez Total

A acidez total é comumente determinada pelo método de titulometria.

Princípio da técnica

Este método baseia-se na reação química entre a solução de concentração conhecida (titulante) e a solução de concentração desconhecida (titulado), com o intuito de quantificar o titulado com base no volume de titulante necessário para atingir o ponto de equivalência, que neste caso ocorre quando o pH atinge 8,2 (ASBC, n.d.).

Protocolo (adaptado de Silva et al. (2022))

1. Adicionar NaOH 0,1M (titulante) a 15 mL da amostra, até elevar o pH até 8,2. **Nota:** o leitor de pH deve ser previamente calibrado de acordo com as instruções do equipamento.
2. Calcular a acidez total pela fórmula:

$$\text{Acidez Total (\% de ácido láctico)} = \frac{(\text{Volume de NaOH} \times 0,9)}{\text{Volume de titulado}}$$

Protocolo Experimental 1

ASBC. (n.d.). Beer 8. Total acidity as "titratable acidity." Retrieved September 30, 2024, from <https://www.asbcnet.org/Methods/BeerMethods/Pages/Beer-8-MasterMethod.aspx>

Silva, S., Oliveira, A., Cruz, A., Oliveira, R., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and antioxidant activity of portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, 27(8007), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>

Materiais requisitados:

Leitor de pH.

Reagentes:

Hidróxido de sódio (NaOH).

Soluções de ensaio:

Solução stock:

Solução de NaOH 0,1 M (M=39,997 g/mol): Pesar 0,3999 g de NaOH e dissolver em 100 mL de água destilada.

Protocolo Experimental 2

Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative analysis of reducing sugars by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNSA method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques* (pp. 181–183). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43

Silva, S., Oliveira, A., Cruz, A., Oliveira, R., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and antioxidant activity of portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, 27(8007), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>

Materiais requisitados:

Espectrofotómetro UV/VIS.

Reagentes:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS);

Glicose;

Hidróxido de sódio (NaOH).

Soluções de ensaio:

Solução de glicose 1000 mg/L:

Dissolver 0,0100 g de glicose em 10 mL de água destilada.

Solução de DNS 1%:

Dissolver 0,0400g de DNS em 800 µL de NaOH 2 M. Adicionar 1,2000 g de tartarato de sódio e potássio. Diluir em 40 mL de água destilada.

Nota:

Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

Teor de Açúcares Redutores (TAR)

O TAR é comumente determinado pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Princípio da técnica

O ensaio DNS baseia-se na oxidação dos grupos carbonilo dos açúcares redutores pelo reagente DNS, resultando numa mudança de cor da solução de amarelo para vermelho-castanho (Jain et al., 2020). A intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes na amostra (Jain et al., 2020).

Protocolo (adaptado de Silva et al. (2022))

Preparação da curva de calibração

1. Construir uma curva de calibração na faixa de concentrações finais 50–1000 mg/L:
 - 1.1. Dissolver a solução de glicose 1000 mg/L em água destilada de forma a preparar o volume total de 3 mL das soluções de concentração 50, 100, 200, 400, 600 e 800 mg/L;
 - 1.2. Misturar 1000 µL da solução de glicose diluída com 1000 µL da solução de DNS (1%); (Realizar 3 ensaios independentes)
 - 1.3. Preparar um branco para cada ensaio independente (1000 µL de água destilada + 1000 µL da solução de DNS (1%));
 - 1.4. Incubar a 100 °C durante 5 minutos no escuro. De seguida, incubar em banho de gelo durante 5 minutos;

- 1.5. Ler a absorvância a 540 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, contra o branco preparado;
- 1.6. Construir a curva de calibração (faixa de linearidade = 50-1000 mg/L, $r > 0,999$).

Ensaio TAR

1. Adicionar 1000 μ L da solução de DNS (1%) a 1000 μ L da amostra (cerveja, e cerveja + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins"); (Realizar 3 ensaios independentes)
2. Preparar um branco para cada ensaio independente (1000 μ L de água destilada + 1000 μ L da solução de DNS (1%));
3. Incubar a 100 °C durante 5 minutos no escuro. De seguida, incubar em banho de gelo durante 5 minutos no escuro;
4. Ler a absorvância a 540 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, contra o branco preparado;
5. Converter os valores da absorvância em mg de equivalentes de glicose (GE)/L de amostra por meio da curva de calibração de glicose, para obter uma correlação entre a absorvância da amostra e a concentração padrão (faixa de linearidade = 50-1000 mg/L, $r > 0,999$).

Protocolo Experimental 2

Solução stock:

Solução de NaOH 2 M (M=39,997 g/mol): Pesar 1,5999 g de NaOH e dissolver em 20 mL de água destilada.

Protocolo Experimental 3

Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications* (pp. 107–115). <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

Pires, J. S., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C., & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1–5.

Silva, S., Oliveira, A., Cruz, A., Oliveira, R., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and antioxidant activity of portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, 27(8007), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>

Materiais requisitados:

Espectrofotômetro UV/VIS.

Reagentes:

Ácido gálico;

Carbonato de sódio (Na_2CO_3);

Folin-Ciocalteu.

Soluções de ensaio:

Solução de ácido gálico 1 mg/mL: Pesar 0,0010 g de ácido gálico e dissolver em 1 mL de água destilada.

Ensaio Teor de Fenólicos Totais (TPC)

O TPC é comumente determinado pelo método *de Folin Ciocalteu*.

Princípio da técnica

Este método baseia-se na reação de transferência de elétrons, na qual se mede a capacidade redutora do antioxidante, ou seja, a capacidade dos compostos fenólicos, presentes na amostra, reduzirem o reagente *Folin-Ciocalteu*, alterando a coloração de amarelo para azul (Lamuela-Raventós, 2017; Pires et al., 2017).

O ácido gálico é, habitualmente, usado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/L) (Pires et al., 2017).

Protocolo (adaptado de Silva et al. (2022))

Preparação da curva de calibração

1. Construir uma curva de calibração na faixa de concentrações finais 5–100 $\mu\text{g/mL}$:
 - 1.1. Dissolver a solução de ácido gálico 1 mg/mL em água destilada de forma a preparar o volume total de 2 mL das soluções de concentração 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$;
 - 1.2. Misturar 250 μL da solução de ácido gálico diluída com 1,25 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* 0,2 M. Repousar por 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, adicionar 2 mL de solução de Na_2CO_3 (75 g/L) e adicionar água destilada até perfazer 5mL; (Realizar 3 ensaios independentes)

- 1.3. Preparar um branco para cada ensaio independente (250 μ L de água destilada + 1,25 mL de *Folin-Ciocalteu* + 2 mL de Na_2CO_3);
- 1.4. Incubar a mistura por 1 hora, à temperatura ambiente no escuro;
- 1.5. Ler a absorvância a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, contra o branco preparado;
- 1.6. Construir a curva de calibração (faixa de linearidade = 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r > 0,999$).

Ensaio TPC

1. Misturar 250 μ L da amostra (1 mg/mL) com 1,25 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* 0,2 M. Repousar por 5 minutos, à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, adicionar 2 mL de solução de Na_2CO_3 (75g/L). Adicionar água destilada até perfazer 5 mL; (Realizar 3 ensaios independentes)
2. Preparar um branco para cada ensaio independente (250 μ L de água destilada + 1,25 mL de *Folin-Ciocalteu* + 2 mL de Na_2CO_3);
3. Incubar a mistura por 1 hora, à temperatura ambiente no escuro;
4. Ler a absorvância a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, contra o branco preparado;
5. Converter os valores da absorvância em mg GAE/L da amostra por meio da curva de calibração de ácido gálico, para obter uma correlação entre a absorvância da amostra e a concentração padrão (faixa de linearidade = 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r > 0,999$).

Protocolo Experimental 3

Solução de Na_2CO_3 75 g/L:

Dissolver 3,7500 g de Na_2CO_3 em 50 mL de água destilada.

Reagente *Folin-Ciocalteu* 0,2 M:

Diluir 3,1 mL de *Folin-Ciocalteu* em 27,9 mL de água destilada.

(volume suficiente para construção da curva de calibração nas condições descritas no ensaio)

ou

Solução de Na_2CO_3 75 g/L:

Dissolver 0,9750 g de Na_2CO_3 em 13 mL de água destilada.

Reagente *Folin-Ciocalteu* 0,2 M:

Diluir 0,8 mL de *Folin-Ciocalteu* em 7,2 mL de água destilada.

Solução amostra 1 mg/mL:

Pesar 0,0010 g da amostra e dissolver em 1 mL de água destilada.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra nas condições descritas no ensaio)

Nota:

Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

Protocolo Experimental 4

Petrón, M. J., Andrés, A. I., Esteban, G., & Timón, M. L. (2021). Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. *Journal of Cereal Science*, 98(103162), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103162>

Re, R., Pellegrin, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

Materiais requisitados:

Espectrofotômetro UV/VIS.

Reagentes:

Ácido 2,2'-azino-bis(3-
etilbenzotiazolína-6-sulfónico)
(ABTS);

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

Etanol absoluto;

Persulfato de potássio ($K_2O_8S_2$);

Tampão fosfato-salino (PBS).

Soluções de ensaio:

Solução amostra 15 mg/mL:

Dissolver 0,2250 g da amostra em 15 mL de água destilada.

Ensaio de Neutralização do Ácido 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS)

O ensaio de neutralização do ABTS é utilizado para detetar a capacidade antioxidante das amostras em estudo.

Princípio da técnica

O ensaio baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o radical $ABTS^+$, através da transferência de um eletrão ou pela cedência de um hidrogénio (Re et al., 1999). Na presença do radical $ABTS^+$ a solução apresenta uma coloração azul-esverdeado, diminuindo a intensidade de coloração quando o mesmo é neutralizado (Re et al., 1999).

Protocolo (adaptado de Petró et al. (2021))

Preparação da amostra e controlo-positivo

O seguinte ensaio é adaptado para testar 9 concentrações diferentes da cerveja, extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e cerveja + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e Trolox (controlo-positivo). Desta forma, para cada amostra foram efetuadas 9 concentrações 10 vezes mais concentradas, obtendo-se as concentrações 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{g/mL}$ para serem testadas.

Ensaio ABTS

1. Misturar 2,5 mL da solução de ABTS 7 mM com 2,5 mL da solução de $K_2O_8S_2$ 2,45 mM. Homogeneizar e deixar repousar à temperatura ambiente durante 12–16 horas, no escuro;

2. Findo esse tempo, ler a absorvância a 734 nm no espectrofotômetro UV-Vis, até atingir uma absorvância igual 0,70 (ajustar com a adição de PBS se a absorvância > 0,70 ou com a adição de ABTS⁺ se a absorvância < 0,70), contra o branco (PBS);
3. Adicionar 2700 µL da solução de ABTS⁺ a 300 µL da amostra ou de trolox, nas diferentes concentrações; (Realizar 3 ensaios independentes)
4. Preparar um branco para cada ensaio independente (300 µL de água destilada + 2700 µL da solução de ABTS⁺);
5. Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente no escuro, medir a absorvância a 734 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis;
6. Medir a absorvância das amostras/controlo-positivo iniciais e após adição da solução de ABTS⁺, e do branco a 734 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis;
7. Calcular a atividade de neutralização do radical ABTS⁺ pela fórmula:

$$\text{Inibição de ABTS (\%)} = \frac{(\text{Abs. B} - \text{Abs. A})}{\text{Abs. B}} \times 100$$

Abs. A: (Absorvância da amostra + solução de ABTS⁺) - Absorvância da amostra inicial; Abs. B: Absorvância do branco.

8. Expressar o resultado em IC₅₀.

Protocolo Experimental 4

Solução de Trolox 15 mg/mL:

Dissolver 0,2250 g de trolox em 15 mL de etanol absoluto.

Solução ABTS 7 mM (M= 548,680

g/mol): Dissolver 0,0096 g de ABTS em 2,5 mL de água destilada.

Solução de K₂O₈S₂ 2,45 mM

(270,322 g/mol): Dissolver 0,0017 g de K₂O₈S₂ em 2,5 mL de água destilada.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra nas condições descritas no ensaio)

Nota:

Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

Protocolo Experimental 5

Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., & Malik, S. A. (2015). Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Research Notes*, 8(279), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>

Nur Alam, M., Jahan Bristi, N., & Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.jps.2012.05.002>

Materiais requisitados:

Espectrofotómetro UV/VIS;
Leitor de pH.

Reagentes:

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4);
Hidróxido de sódio (NaOH);
Peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Soluções de ensaio:

Solução amostra 7,5 mg/mL:
Dissolver 0,1125 g da amostra em 15 mL de água destilada.

Solução de ácido ascórbico 7,5 mg/mL:

Dissolver 0,1125 g de ácido ascórbico em 15 mL de água destilada.

Ensaio Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2)

O ensaio peróxido de hidrogénio é utilizado para determinar a capacidade antioxidante das amostras em estudo.

Princípio da técnica

O H_2O_2 decompõe-se em água e oxigénio o que pode resultar na formação de radicais hidroxilo. O antioxidante irá neutralizar as moléculas de H_2O_2 , impedindo que este forme radicais livres iniciadores da cadeia oxidativa (Nur Alam et al., 2012).

Protocolo (adaptado de Bhatti et al. (2015))

Preparação da amostra e controlo-positivo

O seguinte ensaio é adaptado para testar 9 concentrações diferentes da cerveja, extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e cerveja + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e ácido ascórbico (controlo-positivo). Desta forma, para cada amostra foram efetuadas 9 concentrações 5 vezes mais concentradas, obtendo-se as concentrações 5, 25, 50, 125, 250, 500, 1250, 2500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$ para serem testadas.

Ensaio H_2O_2

1. Adicionar 3000 μL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, e 1000 μL da solução de H_2O_2 40 mM a 1000 μL da amostra ou de ácido ascórbico, nas diferentes concentrações; (Realizar 3 ensaios independentes)
2. Preparar um branco para cada ensaio independente (1000 μL de água destilada + 3000 μL da solução de tampão KH_2PO_4 0,2 M + 1000 μL da solução de H_2O_2 40 mM);

3. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente no escuro, medir a absorvância a 230 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis;
4. Medir a absorvância das amostras/controlo-positivo iniciais, e do branco a 230 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis;
5. Calcular a atividade de neutralização do radical ABTS⁺ pela fórmula:

$$\text{Neutralização de } H_2O_2 \text{ (\%)} = \frac{(\text{Abs. } B - \text{Abs. } A)}{\text{Abs. } B} \times 100$$

Abs. A: (Absorvância da amostra + tampão fosfato de potássio 0,2 M + solução de H₂O₂ 40 mM) – Absorvância da amostra inicial; Abs.

B: Absorvância do branco.

6. Expressar o resultado em IC₅₀.

Protocolo Experimental 5

Solução de KH₂PO₄ 0,2 M (M=136,086 g/mol): Dissolver 3,4022 g de fosfato de potássio monobásico em 125 mL de água destilada. Adicionar NaOH até obter um valor de pH de 7,4.

Solução de H₂O₂ 40 mM (M=34,015 g/mol, %(m/V)=30%): Dissolver 145,11 µL de H₂O₂ em 31,85 mL da solução de KH₂PO₄ 0,2 M. **Nota:** preparar imediatamente antes da sua utilização.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra nas condições descritas no ensaio)

Nota: Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

Solução stock:

Solução de NaOH 10 M (M=39,997 g/mol): Dissolver 3,9997 g de NaOH em água destilada perfazendo o volume até aos 10 mL.

Protocolo Experimental 6

Censi, R., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Lupidi, G., Angeloni, C., Pruccoli, L., Tarozzi, A., & Martino, P. D. (2021). New antioxidant ingredients from brewery by-products for cosmetic formulations. *Cosmetics*, 8(96), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040096>

Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the addition of propolis extract on bioactive compounds and antioxidant activity of craft beer. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>

Urrea-Victoria, V., Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. A. C. dos, & Chow, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1–6.

Materiais requisitados:

Espectrofotômetro UV/VIS;

Incubadora;

Leitor de pH.

Reagentes:

2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ);

Acetato de sódio;

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

(Trolox);

Ácido acético glacial;

Ácido clorídrico;

Cloreto de ferro;

Etanol absoluto.

Ensaio de Determinação do Poder de Redução do Ião Ferro (FRAP)

O ensaio FRAP permite a determinação do poder antioxidante das amostras em estudo.

Princípio da técnica

O ensaio baseia-se na redução do ião férrico (Fe^{3+}), presente no complexo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), a ião ferroso (Fe^{2+}) pela transferência de elétrões. Quando ocorre a redução a solução altera a sua coloração de roxo-claro para roxo-intenso (Urrea-Victoria et al., 2016).

Protocolo (adaptado de Censi et al. (2021) e Ulloa et al. (2017))

Solução de trabalho com TPTZ:

1. Misturar 75 mL de acteto de buffer 0,3 M, 7,5 mL da solução de TPTZ 10 mM e 7,5 mL de solução de cloreto de ferro 20 mM; **Nota:** Os volumes mencionados são necessários para a construção da curva de calibração. Para testar uma única amostra é necessário um volume total de 14,40 mL de solução de trabalho com TPTZ.
2. Proteger da luz e colocar no gelo.

Preparação da curva de calibração

1. Construir uma curva de calibração na faixa de concentrações finais 25–900 μM :

- 1.1. Dissolver a solução de trolox 1000 μM em água ultrapura de forma a preparar o volume total de 80 μL das soluções de concentração 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 μM . Adicionar 2400 μL de solução de trabalho de TPTZ; (Realizar 3 ensaios independentes)
- 1.2. Preparar um branco para cada ensaio independente (80 μL de água ultrapura + 2400 μL de solução de trabalho de TPTZ);
- 1.3. Finda a preparação das diferentes concentrações a serem testadas, incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$, no escuro, durante 15 minutos;
- 1.4. Seguidamente, deixar repousar, à temperatura ambiente no escuro, durante 5 minutos;
- 1.5. Medir a absorvância a 593 nm usando um espectrofotómetro UV/VIS, contra o branco preparado;
- 1.6. Construir a curva de calibração (faixa de linearidade = 25–900 μM , $r > 0,999$).

Ensaio FRAP

1. Adicionar 2400 μL da solução de trabalho TPTZ a 80 μL da amostra 10 mg/mL (cerveja, extrato aquoso/etanólico de cereja variedade “Lapins”, e cerveja + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade “Lapins”); (Realizar 3 ensaios independentes)

Protocolo Experimental 6

Soluções stock:

Solução de acetato de Buffer 0,3 M (M=82,034 g/mol): Dissolver 2,4610 g de acetato de sódio em 10 mL de água ultrapura. Adicionar ácido acético glacial até obter um valor de pH de 3,6. Posto isto, perfazer o volume até aos 100 mL com água ultrapura.

Solução de ácido clorídrico (HCl) 40 mM (36,461 g/mol): Dissolver 78,8 μL de HCl a 37% em água ultrapura, perfazendo o volume de 20 mL.

Soluções de ensaio:

Solução de TPTZ 10 mM (M=312,332 g/mol): Dissolver 0,0312 g de TPTZ em HCl 40 mM perfazendo o volume de 10 mL.

Solução de Cloreto de Ferro 20 mM (M=162,204 g/mol): Dissolver 0,0324 g de cloreto de ferro em água ultrapura perfazendo o volume de 10 mL.

Solução Trolox 1000 μM (M=250,291 g/mol): Dissolver 0,0063 g de trolox em etanol absoluto perfazendo o volume de 25 mL.

Protocolo Experimental 6

Solução amostra 10 mg/mL:

Dissolver 0,0100 g da amostra em 1 mL de água destilada.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra nas condições descritas no ensaio)

Nota: as soluções de cloreto de ferro e de trolox devem ser preparadas no dia do ensaio e devem ser colocadas no gelo. Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

2. Preparar um branco para cada ensaio independente (80 μL de água ultrapura + 2400 μL de solução de trabalho de TPTZ);
3. Incubar a 37 °C durante 15 minutos, e repousar, à temperatura ambiente no escuro, durante 5 minutos;
4. Medir a absorvância a 593 nm usando um espectrofotômetro UV/VIS, contra o branco preparado;
5. Converter os valores da absorvância em μmol de equivalentes de trolox (TE)/g da amostra por meio da curva de calibração de trolox, para obter uma correlação entre a absorvância da amostra e a concentração padrão (faixa de linearidade = 25–900 μM , $r > 0,999$).

Ensaio Atividade Quelante de Metais (MCA)

O ensaio MCA, também designado de ensaio da ferrozina, é utilizado para determinação da atividade antioxidante das amostras em estudo.

Princípio da técnica

O ensaio baseia-se na capacidade do antioxidante quelar o íon ferroso (Fe^{2+}), prevenindo a sua oxidação e a formação de complexos com a ferrozina (Adjimani & Asare, 2015). Quando o Fe^{2+} reage com a ferrozina forma um complexo vermelho (Adjimani & Asare, 2015). Desta forma, quanto mais incolor for a solução maior será a atividade antioxidante da amostra.

Protocolo (adaptado de S. Silva et al. (2022))

Preparação da amostra e controlo-positivo

O seguinte ensaio é adaptado para testar 9 concentrações diferentes da cerveja, extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e cerveja + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade "Lapins", e EDTA (controlo-positivo). Desta forma, para cada amostra foram efetuadas 9 concentrações 3 vezes mais concentradas, obtendo-se as concentrações 3, 15, 30, 75, 150, 300, 750, 1500 e 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para serem testadas.

Ensaio da Ferrozina

1. Numa placa de 96 poços adicionar a cada 3 poços 50 μL da amostra ou de EDTA, a diferentes concentrações e 50 μL de solução FeSO_4 0,15 mM. Repousar por 5 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz;

Protocolo Experimental 7

Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>

Silva, S., Oliveira, A., Cruz, A., Oliveira, R., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical Properties and antioxidant activity of portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, 27(8007), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules27228007>

Material requisitado:

Leitor de microplacas;
Microplaca de 96 poços.

Reagentes:

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA);
Hidrato de sal monossódico do ácido 5,6-difenil-3-(2-piridil)-1,2,4-triazina-4,4"-dissulfónico (Ferozina);
Sulfato ferroso (FeSO_4).

Soluções de ensaio:

Solução de FeSO_4 0,15 mM (M=151,908 g/mol): Dissolver 0,0011 g de sulfato ferroso em água destilada perfazendo o volume até aos 50 mL.
Nota: Armazenar no frigorífico.

Solução de Ferozina 0,5 mM (M=492,462 g/mol): Dissolver 0,0012 g de ferrozina em 5 mL de água destilada. **Nota:** Armazenar no frigorífico.

Protocolo Experimental 7

Solução amostra 3 mg/mL:

Dissolver 0,0045 g da amostra em 1,5 mL de água destilada.

Solução de EDTA 3 mg/mL:

Dissolver 0,0045 g de EDTA em 1,5 mL de água destilada.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra nas condições descritas no ensaio)

Nota: Todas as soluções preparadas são sensíveis à luz.

Seguir o seguinte esquema (usar metade da placa de 96 poços por ensaio independente):

A1	A1	A1	B1	C	A9
A2	A2	A2	B2	C	A9
A3	A3	A3	B3	C	A9
A4	A4	A4	B4		
A5	A5	A5	B5		B9
A6	A6	A6	B6		
A7	A7	A7	B7		
A8	A8	A8	B8		

1 - menor concentração da amostra

...

9 - maior concentração da amostra

50 µL de extrato + 50 µL de FeSO₄ 0,15mM + 50 µL de ferrozina

50 µL de extrato + 50 µL de FeSO₄ 0,15mM

50 µL de FeSO₄ 0,15mM + 50 µL de ferrozina

2. Adicionar 50 µL de ferrozina 0,5 mM. Agitar vigorosamente em cruz e deixar repousar por 10 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz; (Realizar 3 ensaios independentes)

3. Ler a absorvância a 562 nm com recurso a um leitor de microplacas;

4. Calcular a capacidade quelante das amostras usando a fórmula:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \frac{(\text{Abs. C} - \text{Abs. A})}{\text{Abs. C}} \times 100$$

Abs. A: Absorvância da amostra (Extrato + Sulfato ferroso + Ferrozina) – Absorvância controlo-negativo (Extrato + Sulfato ferroso); Abs. C: Absorvância do controlo-positivo (Sulfato ferroso + Ferrozina).

5. Expressar o resultado em IC₅₀.

Cultura de células HepG2

As linhagens de células de hepatoma humano, HepG2, exibem morfologia semelhante à epitelial e foram isoladas de um jovem branco de 15 anos com carcinoma hepatocelular.

Princípio da técnica

As linhagens de células HepG2 crescem e replicam-se indefinidamente em cultura com os nutrientes apropriados, sendo usadas *in vitro* para diversos tipos de pesquisa.

Protocolo de descongelamento de células

1. Colocar as alíquotas do meio de cultura (MEM) em banho de água a 37 °C durante 10 minutos;
2. Descongelar, à temperatura ambiente ou em banho de água a 37 °C, as alíquotas com as células, não ultrapassando os 2/3 minutos para diminuir o stress celular;
Nota: A partir deste ponto todas as operações devem ser realizadas sob condições assépticas. E todo o material deve ser pulverizado com álcool a 70° antes de ser colocado no interior da CFLV.
3. Em simultâneo com o descongelamento, transferir 4 mL de meio de cultura para um frasco de cultura celular de 25 cm²;
4. De seguida, transferir 1 mL da suspensão celular para o frasco de cultura celular, e homogeneizar em cruz;
5. Incubar na estufa a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO₂.

Protocolo Experimental 8

Para mais informações consultar Ficha do Produto HepG2 HB-8065 (www.atcc.org)

Material requisitado:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar vertical (CFLV);
Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO₂;
Frasco de cultura celular 25 cm².

Reagentes:

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM);
Mistura de antibiótico-antimicótico;
Soro bovino fetal (FBS).

Soluções:

O meio MEM é suplementado com 10% de FBS e 1% da mistura de antibiótico-antimicótico.

Protocolo Experimental 8

Material requisitado:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar vertical (CFLV);
Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO₂;
Microscópio ótico invertido.

Reagentes:

Meio MEM.

Nota: Proceder-se à mudança de meio de cultura se a confluência das células for inferior a 80%.

Material requisitado:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar vertical (CFLV);
Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO₂;
Microscópio ótico invertido.

Reagentes:

Meio MEM;
Tampão fosfato-salino (PBS);
Tripsina.

Protocolo de mudança de meio de cultura

1. Colocar a alíquota do meio de cultura (MEM) em banho de água a 37 °C durante 10 minutos;
Nota: todo o material é pulverizado com álcool a 70° antes de ser colocado no interior da CFLV.
2. Retirar o frasco com a cultura celular da estufa e observar as células ao microscópio ótico invertido;
3. No interior da CFLV, aspirar o meio sobrenadante presente no frasco de cultura celular;
4. Adicionar 5 mL do meio MEM;
5. Homogeneizar o frasco de cultura em cruz e armazenar na estufa à temperatura de 37 °C e 5% de CO₂.

Protocolo de subcultura

Quando as células estão confluentes é necessário proceder à subcultura, de forma a que estas possam continuar a crescer.

1. Colocar a alíquota do meio de cultura, PBS e tripsina em banho de água a 37 °C durante 10 minutos;
Nota: as alíquotas são pulverizadas com álcool a 70° antes de serem colocadas no interior da CFLV.
2. Observar o frasco de cultura celular no microscópio ótico invertido, assegurando que as células se encontram em monocamada (confluência > 80%);
3. No interior da CFLV, aspirar o meio de cultura do frasco de cultura celular, e adicionar 5 mL de PBS. Homogeneizar frasco de cultura celular em cruz. Aspirar o PBS;
4. Adicionar 1 mL de tripsina ao frasco de cultura celular;

5. Colocar os frascos de cultura celular na estufa à temperatura de 37 °C e 5% de CO₂ durante cerca de 2/3 minutos (até se observar as células a desaderirem do frasco de cultura, sendo visível a olho nu);
6. Adicionar 4 mL de meio de cultura ao frasco de cultura celular, que contém células + tripsina; (**Nota:** se necessário coloca mL a mL e ressuspender)
7. Transferir o conteúdo do frasco de cultura celular para um tubo falcon (15 mL), identificar o falcon;
8. Transferir para um frasco de cultura de 25 cm², previamente identificado (com o tipo de células em crescimento, a passagem e a data de tripsinização), 4000 µL do meio de cultura, e adicionar 1000 µL de células em suspensão presentes no tubo falcon;
9. Homogeneizar o frasco de cultura em cruz;
10. Armazenar na estufa a 37 °C e 5% CO₂.

Protocolo de congelamento

1. Na CFLV, transferir 1 mL de células em suspensão (células do protocolo de subcultura) para um criotubo;
2. Adicionar 100 µL de DMSO (gota a gota);
3. Identificar os criotubos com a linhagem celular e data;
4. Armazenar os criotubos a -80 °C (por menor período de tempo) ou em azoto líquido (por maior período de tempo).

Protocolo Experimental 8

Nota: O meio deve ser renovado pelo menos duas vezes por semana. Após 1 semana, a camada celular é normalmente confluyente e pronta para subcultura.

Os volumes utilizados neste protocolo são para frascos de 25 cm².

Material requisitado:

Câmara de fluxo laminar vertical (CFLV);
Criotubos.

Reagentes:

Dimetilsulfóxido (DMSO).

Protocolo Experimental 9

Carvalho, A. C., Franklin, G., Dias, A. C. P., & Lima, C. F. (2014). Methanolic extract of *Hypericum perforatum* cells elicited with *Agrobacterium tumefaciens* provides protection against oxidative stress induced in human HepG2 cells. *Industrial Crops and Products*, 59, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.018>

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12827), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

Merck. (n.d.). MTT assay protocol for cell viability and proliferation. Retrieved August 2, 2024, from <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>

Viegas, O., Žegura, B., Pezdiric, M., Novak, M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., & Filipič, M. (2012). Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 949–955. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.031>

Materiais requisitados:

Banho de água;

Câmara de fluxo laminar vertical;

Câmara de Neubauer;

Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO₂;

Leitor de microplacas;

Miscoscópio ótico invertido.

Reagentes:

Dimetilsulfóxido (DMSO);

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM);

Etanol absoluto;

Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT);

Tampão fosfato-salino (PBS).

Ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular/atividade metabólica das células HepG2 (Merck, n.d.).

Princípio da técnica

O ensaio baseia-se na redução do MTT (sal de tetrazólio amarelo) a cristais roxos de formazano por células metabolicamente ativas, através de ação enzimática (Merck, n.d.). Os cristais de formazano são, posteriormente, dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido), a fim de serem quantificados por espectrofotometria, sendo a absorvância diretamente proporcional à viabilidade celular/atividade metabólica (Ghasemi et al., 2021).

Protocolo (adaptado de Carvalho et al. (2014) e Viegas et al. (2012))

Toxicidade celular

1. Cultivar as células HepG2 numa microplaca de 96 poços, numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço (100 µL/poço);

Nota: é necessária a determinação do número de células na suspensão celular usando a câmara de Neubauer.

2. Após 48 horas de incubação numa estufa a 37 °C e 5% CO₂, remover o meio, e adicionar meio de cultura + DMSO 0,5% e a amostra (cerveja em solvente aquoso/etanólico, extrato aquoso/etanólico de cereja variedade “Lapins”, cerveja em solvente aquoso/etanólico + extrato aquoso/etanólico de cereja variedade “Lapins” de forma a serem testadas as

concentrações 1, 5 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL,
conforme o esquema:

Protocolo Experimental 9

C	C	C	500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL	100 µg/mL
50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
1 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL									

C: meio + DMSO 0,5%; **500 µL/mL:** 100 µL S1; **250 µL/mL:** 50 µL de meio + DMSO 0,5% + 50 µL S1; **100 µL/mL:** 80 µL de meio + DMSO 0,5% + 20 µL S1; **50 µL/mL:** 90 µL de meio + DMSO 0,5% + 10 µL S1; **25 µL/mL:** 95 µL de meio + DMSO 0,5% + 5 µL S1; **10 µL/mL:** 100 µL S2; **5 µL/mL:** 50 µL de meio + DMSO 0,5% + 50 µL S2; **1 µL/mL:** 90 µL de meio + DMSO 0,5% + 10 µL S2.

- Incubar a placa numa estufa a 37 °C e 5% de CO₂, por 24 horas ou 48 horas, conforme a especificidade do ensaio; (Realizar 3 ensaios independentes)
- Findado o tempo de incubação adicionar 10 µL MTT 5 mg/mL;
- Incubar a placa 1 hora na estufa a 37 °C e 5% CO₂;
- Após esse tempo, remover o meio, e adicionar 100 µL de DMSO + Etanol (50:50 (V/V)) para dissolver os cristais de formazano;
- Medir a absorvância a 570 nm com recurso a um leitor de microplacas;
- Calcular a % de viabilidade celular/ atividade metabólica pela fórmula:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{Abs.A}{Abs.C} \times 100$$

Abs.A: Absorvância da amostra; Abs. C: Absorvância do controlo (poços sem extrato).

Soluções stock:

MTT 5 mg/mL: Dissolver 0,05 g de MTT em 10 mL de PBS (adicionar 2 mL de cada vez e agitar). Armazenar alíquotas a -20 °C e ao abrigo da luz.

Solução de DMSO+etanol (50:50): Dissolver 50 mL de DMSO em 50 mL de etanol absoluto.

Soluções de ensaio:

Solução amostra 1 mg/mL: Dissolver 0,0001 g da amostra em 1 mL de água destilada.

Solução de meio + DMSO 0,5%: Dissolver 50 µL de DMSO em 9,950 mL de meio de cultura.

Solução stock 1 da amostra (S1): Dissolver 500 µL da amostra 1 mg/mL em 500 µL de meio + DMSO 0,5%.

Solução stock 2 da amostra (S2): Dissolver 10 µL da amostra 1 mg/mL em 990 µL de meio + DMSO 0,5%.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra num ensaio independente)

Protocolo Experimental 9

Materiais requisitados:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar vertical;
Câmara de Neubauer;
Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO₂;
Leitor de microplacas;
Microscópio óptico invertido.

Reagentes:

Meio MEM;
MTT;
PBS;
tert-butil hidroperóxido (*t*-BOOH).

Determinação da concentração e tempo de tóxico a usar

1. Cultivar as células HepG2 em 36 poços de 3 microplacas de 96 poços, numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço (100 µL/poço);

Nota: é necessária a determinação do número de células na suspensão celular usando a câmara de Neubauer.

2. Após 48 horas de incubação numa estufa a 37 °C e 5% CO₂, remover o meio, e adicionar 100 µL de *t*-BOOH nas concentrações 1 mM, 2,5 mM e 4 mM, conforme o esquema:

Meio	Meio	Meio	1mM	1mM	1mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	4mM	4mM	4mM
Meio	Meio	Meio	1mM	1mM	1mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	4mM	4mM	4mM
Meio	Meio	Meio	1mM	1mM	1mM	2,5mM	2,5mM	2,5mM	4mM	4mM	4mM

Soluções de ensaio:

Solução de *t*-BOOH 100 mM (5,0-6,0 M): Dissolver 18,18 µL de *t*-BOOH em 981,82 µL de PBS.

Solução de *t*-BOOH 1 mM: Dissolver 30 µL de *t*-BOOH 100 mM em 2970 µL de meio de cultura.

Solução de *t*-BOOH 2,5 mM: Dissolver 75 µL de *t*-BOOH 100 mM em 2925 µL de meio de cultura.

Solução de *t*-BOOH 4 mM: Dissolver 120 µL de *t*-BOOH 100 mM em 2880 µL de meio de cultura.

(todas as soluções são preparadas com volume suficiente para o ensaio descrito)

3. Incubar numa estufa a 37 °C e 5% CO₂ durante 1 hora, 2 horas e 3 horas;
4. Findado o tempo de incubação adicionar 10 µL MTT 5 mg/mL;
5. Incubar a placa 1 hora na estufa a 37 °C e 5% CO₂;
6. Após esse tempo, remover o meio, e adicionar 100 µL de DMSO + Etanol (50:50 (V/V)) para dissolver os cristais de formazano;
7. Medir a absorvância a 570 nm com recurso a um leitor de microplacas;
8. Calcular a % de viabilidade celular/ atividade metabólica pela fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Abs. A}}{\text{Abs. C}} \times 100$$

Abs. A: Absorvância da amostra; Abs. C: Absorvância do control (poços sem extrato).

Ensaio de pré-incubação

1. Cultivar as células HepG2 numa microplaca de 96 poços, numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço (100 μL /poço);

Nota: é necessária a determinação do número de células na suspensão celular usando a câmara de Neubauer.

2. Após 48 horas de incubação numa estufa a 37°C e 5% CO_2 , remover o meio, e adicionar meio de cultura + DMSO 0,5% e a amostra (cerveja aquoso/etanólico, extrato aquoso/etanólico de cereja "Lapins", cerveja aquoso/etanólico + extrato aquoso/etanólico de cereja "Lapins") de forma a serem testadas as concentrações 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme o esquema (Realizar 3 ensaios independentes):

C	C	C	CN	CN	CN	CP	CP	CP	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$			

C: meio; CN: meio; CP: curcumina 20 μL ; 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 100 μL S1; 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 50 μL de meio + DMSO 0,5% + 50 μL S1; 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 80 μL de meio + DMSO 0,5% + 20 μL S1; 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 90 μL de meio + DMSO 0,5% + 10 μL S1; 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 95 μL de meio + DMSO 0,5% + 5 μL S1; 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 100 μL S2; 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 50 μL de meio + DMSO 0,5% + 50 μL S2; 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 90 μL de meio + DMSO 0,5% + 10 μL S2

3. Incubar numa estufa a 37°C e 5% CO_2 durante 5 horas;
4. Findado o tempo, remover o meio e colocar 100 μL de meio de cultura em cada poço. Incubar numa estufa a 37°C e 5% CO_2 durante 16 horas;
5. Após esse tempo remover o meio dos poços e adicionar 100 μL de meio + DMSO 0,5% + tóxico, na concentração previamente definida. Seguir o esquema:

Protocolo experimental 9

Materiais requisitados:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar;
Câmara de Neubauer;
Estufa incubadora 37°C e 5% de CO_2 ;
Leitor de microplacas;
Microscópio ótico invertido.

Reagentes:

Dimetilsulfóxido (DMSO);
Meio MEM;
MTT.
PBS;
tert-butil hidroperóxido (*t*-BOOH);

Soluções de ensaio:

Solução de meio + DMSO 0,5%:
Dissolver 42,5 μL de DMSO em 8,458 mL de meio de cultura.
(volume suficiente para 2 repetições/1 placa)

Solução amostra 1 mg/mL:
Dissolver 0,0010 g da amostra em 1 mL de água destilada.

Solução stock 1 da amostra (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (S1): Dissolver 500 μL da amostra 1 mg/mL em 500 μL de meio + DMSO 0,5%.

Protocolo Experimental 9

C Meio + DMSO	C Meio + DMSO	C Meio + DMSO	CN Meio + DMSO+ Tóxico	CN Meio + DMSO+ Tóxico	CN Meio + DMSO+ Tóxico	CP Meio + DMSO+ Tóxico	CP Meio + DMSO+ Tóxico	CP Meio + DMSO+ Tóxico	500 Meio + DMSO+ Tóxico	500 Meio + DMSO+ Tóxico	500 Meio + DMSO+ Tóxico
250 Meio + DMSO+ Tóxico	250 Meio + DMSO+ Tóxico	250 Meio + DMSO+ Tóxico	100 Meio + DMSO+ Tóxico	100 Meio + DMSO+ Tóxico	100 Meio + DMSO+ Tóxico	50 Meio + DMSO+ Tóxico	50 Meio + DMSO+ Tóxico	50 Meio + DMSO+ Tóxico	25 Meio + DMSO+ Tóxico	25 Meio + DMSO+ Tóxico	25 Meio + DMSO+ Tóxico
10 Meio + DMSO+ Tóxico	10 Meio + DMSO+ Tóxico	10 Meio + DMSO+ Tóxico	5 Meio + DMSO+ Tóxico	5 Meio + DMSO+ Tóxico	5 Meio + DMSO+ Tóxico	1 Meio + DMSO+ Tóxico	1 Meio + DMSO+ Tóxico	1 Meio + DMSO+ Tóxico			

Solução stock 2 da amostra (10 µg/mL) (S2): Dissolver 10 µL da amostra 1 mg/mL em 990 µL de meio + DMSO 0,5%.

(as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra num ensaio independente)

Solução de curcumina 10 mM (M=368,390 g/mol): Dissolver 0,0037 g de curcumina em 1 mL de DMSO.

Solução de curcumina 2 mM: Diluir 20 µL de curcumina 10 mM em 80 µL de DMSO.

Solução de curcumina 20 µM: Dissolver 10 µL de curcumina em 990 µL de meio de cultura.

Solução de t-BOOH 100 mM (5,0-6,0 M): Dissolver 18,2 µL de t-BOOH em 981,8 µL de PBS.

Solução de meio + DMSO 0,5%: Dissolver 37,5 µL de DMSO em 7462,5 µL de meio de cultura.

Solução meio + t-BOOH (2,5 mM): Diluir 162,5 µL de t-BOOH 100 mM em 6337,5 µL de meio + DMSO 0,5%.

(volume suficiente para 2 repetições/1 placa)

6. Incubar numa estufa a 37 °C e 5% CO₂ durante o tempo previamente definido;
7. Findado o tempo de incubação adicionar 10 µL MTT 5 mg/mL;
8. Incubar a placa 1 hora na estufa a 37 °C e 5% CO₂;
9. Após esse tempo, remover o meio, e adicionar 100 µL de DMSO + Etanol (50:50) para dissolver os cristais de formazano;
10. Medir a absorvância a 570 nm com recurso a um leitor de microplacas;
11. Calcular a % de viabilidade celular/ atividade metabólica pela fórmula:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{Abs.\ A}{Abs.\ C} \times 100$$

Abs.A: Absorvância da amostra; Abs. C: Absorvância do controlo (poços sem extrato).

Ensaio de co-incubação

1. Cultivar as células HepG2 numa microplaca de 96 poços, numa densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço (100 μL /poço); **Nota:** é necessária a determinação do número de células na suspensão celular usando a câmara de Neubauer.
2. Após 48 horas de incubação numa estufa a 37 °C e 5% CO_2 , remover o meio, e adicionar meio de cultura + DMSO 0,5%, a amostra (cerveja aquoso/etanólico, extrato aquoso/etanólico de cereja "Lapins", cerveja aquoso/etanólico + extrato aquoso/etanólico de cereja "Lapins") de forma a serem testadas as concentrações 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e adicionar o tóxico na concentração previamente definida, conforme o esquema (Realizar 3 ensaios independentes):

C	C	C	CN	CN	CN	CP	CP	CP	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$			

C: meio; CN: 95 μL meio + 5 μL Tóxico; CP: quercetina 50 μM + 5 μL Tóxico; 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 95 μL S1 + 5 μL Tóxico; 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 47,5 μL meio + 47,5 μL S1 + 5 μL Tóxico; 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 76 μL meio + 19 μL S1 + 5 μL Tóxico; 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 90 μL meio + 9,5 μL S1 + 5 μL Tóxico; 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 90,25 μL meio + 4,75 μL S1 + 5 μL Tóxico; 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 95 μL S2 + 5 μL Tóxico; 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 47,5 μL meio + 47,5 μL S2 + 5 μL Tóxico; 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$: 85,5 μL meio + 9,5 μL S1 + 5 μL Tóxico

3. Incubar numa estufa a 37 °C e 5% CO_2 durante o tempo previamente definido;
4. Findado o tempo de incubação adicionar 10 μL MTT 5 mg/mL ;
5. Incubar a placa 1 hora na estufa a 37 °C e 5% CO_2 ;
6. Após esse tempo, remover o meio, e adicionar 100 μL de DMSO + Etanol (50:50) para dissolver os cristais de formazano;

Protocolo Experimental 9

Materiais requisitados:

Banho de água;
Câmara de fluxo laminar;
Câmara de Neubauer;
Estufa incubadora 37 °C e 5% de CO_2 ;
Microscópio ótico invertido.

Reagentes:

Dimetilsulfóxido (DMSO);
Meio MEM;
MTT;
PBS;
tert-butil hidroperóxido (*t*-BOOH).

Soluções de ensaio:

Solução de meio + DMSO 0,5%:
Dissolver 40 μL de DMSO em 7960 μL de meio de cultura.

(volume suficiente para 2 repetições/1 placa)

Solução amostra 1 mg/mL :
Dissolver 0,0010 g da amostra em 1 mL de água destilada.

Protocolo Experimental 9

Solução stock 1 da amostra 526,3

µg/mL: Dissolver 526,3 µL da amostra 1 mg/mL em 473,7 µL de meio + DMSO 0,5%.

Solução stock 2 da amostra 10,5

µg/mL: Dissolver 10,5 µL da amostra 1 mg/mL em 989,5 µL de meio + DMSO 0,5%.

(as soluções são preparadas com volume suficiente para testar uma amostra num ensaio independente)

Solução de quercetina 10 mM

(M=302,236 g/mol): Dissolver 0,0030 g de quercetina em 1 mL de água destilada.

Solução de quercetina 2 mM:

Diluir 20 µL de quercetina 10 mM em 80 µL de água destilada.

Solução de quercetina 52,6 µM

(testar a concentração 50 µM):

Dissolver 26,3 µL de quercetina em 973,7 µL de meio + DMSO 0,5%.

Solução de t-BOOH 100 mM (5,0–

6,0 M): Dissolver 18,2 µL de t-BOOH em 981,8 µL de PBS.

Solução de t-BOOH 50 mM (testar

concentração 2,5 mM): Dissolver 250 µL de t-BOOH 100 mM em 250 µL de meio + DMSO 0,5%.

(as soluções são preparadas com volume suficiente para 2 repetições/1 placa)

7. Medir a absorvância a 570 nm com recurso a um leitor de microplacas;

8. Calcular a % de viabilidade celular/ atividade metabólica pela fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Abs. A}}{\text{Abs. C}} \times 100$$

Abs.A: Absorvância da amostra; Abs. C: Absorvância do controlo (poços sem extrato).