

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE CERVEJAS COMERCIAIS

Dissertação

PAULA ALEXANDRA RIBEIRO TAFULO


Mestrado em Engenharia Química

Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental

Setembro 2008

Título	CA de Cervejas Comerciais
Autora	Paula Alexandra Ribeiro Tafulo
Orientadora	Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales
Data de publicação	Setembro de 2008

Esta publicação não pode ser reproduzida nem transmitida, no todo ou em parte, por qualquer processo aleatório, mecânico, fotocópia, gravação ou outros, sem prévia autorização escrita do autor.



Agradecimentos

À Doutora Goreti Sales, pela dedicação, disponibilidade e carinho com que se dedicou a este trabalho.

À Doutora Cristina Matos, por ter fornecido as condições logísticas necessárias à realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Vítor Freire, Director do Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, pela pronta disponibilização dos equipamentos e materiais solicitados e pelo entusiasmo que sempre incutiu à sua realização.

À Doutora Maria do Carmo Vaz pelo apoio e entusiasmo que incutiu no decorrer deste trabalho.

À Engenheira Felismina Moreira e à Engenheira Fátima Barroso pelo apoio laboratorial.

À minha amiga, Raquel Queirós por toda a companhia e ajuda ao longo deste trabalho, mas acima de tudo pelo seu companheirismo e amizade.

Ao meu namorado, Paulo Martins, pela paciência que demonstrou ao longo deste trabalho, mas principalmente por todo o carinho e dedicação.

Finalmente aos meus pais, por tudo.

Resumo

O estudo da capacidade antioxidante (CA) de cervejas consistiu na determinação e avaliação da CA de cervejas comerciais, disponíveis no mercado nacional. A CA indica o grau de protecção conferido ao organismo relativamente a danos oxidativos radiculares envolvidos em processos degenerativos. A CA foi determinada pelos métodos (i) *Total radical trapping antioxidant parameter* (TRAP); (ii) *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC); (iii) *Trolox equivalent antioxidant capacity* (DPPH); (iv) *Ferric ion reducing antioxidant parameter* (FRAP); (v) *Cupric reducing antioxidant capacity* (CUPRAC); (vi) *Oxygen radical absorbance capacity* (ORAC). Estes métodos são ópticos e baseiam-se na inibição de radicais livres em solução. Os valores de CA foram calculados relativamente aos compostos ácido ascórbico (AA), ácido gálico (AG) e o trolox (TR).

No sentido de esclarecer o efeito de alguns factores na CA das várias amostras de cerveja procedeu-se à análise estatística dos resultados com base no teste ANOVA (*analysis of variance*). Os factores considerados neste estudo foram: método de análise, composto padrão, marca comercial, tipo, origem, corantes, aromas, antioxidantes, edulcorantes, teor de álcool, cor, sumo e outros aditivos.

O teste ANOVA sugeriu a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as marcas nos métodos FRAP (para o padrão AG) e no método ORAC. Relativamente ao teor de álcool, somente o método ORAC, para os padrões AG e TR, sugeriu existirem dois subgrupos diferentes. Todos os métodos indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos de cores da cerveja.

No estudo relativo ao efeito do método verificou-se que, para todos os padrões, o método ORAC apresentou diferenças estatisticamente significativas dos restantes, tendo valores de CA muito superiores aos dos restantes métodos usados.

No efeito dos padrões concluiu-se que, para todos os métodos, existiam diferenças estatisticamente significativas entre os vários padrões. No método TRAP e CUPRAC todos os padrões se comportaram de forma distinta, nos métodos TEAC e FRAP o padrão AG apresentou CA inferiores aos restantes, pertencendo a um subgrupo diferente. O método DPPH sugeriu que o AG produzia valores de CA superiores aos dos demais padrões. O método ORAC registou um comportamento semelhante, mas para o padrão TR.

Palavras-chave: TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC, ORAC, CA, AA, AG, TR e Antioxidantes.

Abstract

The antioxidant capacity (CA) of beers was studied by means of its determination and evaluation in commercial beers, available in national market. The CA indicates the degree of protection of a certain organism against the radical oxidative damage, correlated to degenerative diseases. The CA was determined several methods, such as (i) Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP); (ii) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC); (iii) Trolox equivalent antioxidant capacity (DPPH); (iv) Ferric ion reducing antioxidant parameter (FRAP); (v) Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC); (vi) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC). These are optical methods based in the inhibition of free radicals in aqueous solution. Ascorbic acid (AA), Gallic acid (AG) and Trolox (TR) were used as standards.

The effect of some factors upon the observed CA was studied by ANOVA statistical analyses (analysis of variance). Method, standard, commercial brand, kind of fermentation (*ale* or *lager*), origin, colorants, flavors, antioxidants, sweeteners, alcohol, color, juice and other additives, were the factors under evaluation.

The ANOVA test suggested statistical differences between commercial brands for FRAP (for the standard AG) and ORAC methods. With regard to alcohol level, only ORAC method (standards AG e TR) suggested significant statistical differences between the observed groups. All methods pointed out statistical differences within the different color groups of beers.

Evaluation of the effect of method upon CA indicated that ORAC provided higher experimental CA values, of significant statistical differences to other methods.

With regard to the effect of standards the observed results depend on the experimental method. TRAP and CUPRAC point out statistical differences within all standards. TEAC and FRAP suggested lower CA for AG. On the contrary, DPPH produced higher CA for AG standard. ORAC method showed statistical differences and higher CA when TR was used as standard.

Key-words: TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC, ORAC, CA, AA, AG, TR and Antioxidants.

Índice Sistemático

1. Introdução	1
1.1 Cerveja	3
1.1.1 História	3
1.1.2 Matérias-Primas	4
1.1.3 Processo Produtivo	5
1.1.4 Classificação genérica da Cerveja	7
1.2 Cerveja e a saúde	8
1.3 Capacidade Antioxidante	10
1.4 Determinação da Capacidade Antioxidante	11
1.4.1 TRAP, <i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>	12
1.4.2 TEAC, <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>	13
1.4.3 DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina	13
1.4.4 FRAP, <i>Ferric reducing antioxidant power</i>	14
1.4.5 CUPRAC, <i>Reducing antioxidant capacity</i>	14
1.4.6 ORAC, <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>	15
2. Parte Experimental	17
2.1 Considerações Gerais	19
2.2 Equipamento e Material	19
2.3 Reagentes	19
2.4 Amostras	21
2.5 Procedimentos	21
2.5.1 TRAP, <i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>	21
2.5.2 TEAC, <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>	21
2.5.3 DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina	22
2.5.4 FRAP, <i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>	22
2.5.5 CUPRAC, <i>Reducing antioxidant capacity</i>	23
2.5.6 ORAC, <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>	23
2.6 Análise estatística de resultados	24
3. Resultados e Discussão	25
3.1 Caracterização das amostras	27
3.2 CA segundo o método	37
3.2.1 TRAP, <i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>	37

3.2.2	TEAC, <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>	41
3.2.3	DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina	45
3.2.4	FRAP, Ferric ion reducing antioxidant power.....	49
3.2.5	CUPRAC, <i>Reducing antioxidant capacity</i>	54
3.2.6	ORAC – Oxigen radical absorbance capacity.....	58
3.3	Efeito da amostra	62
3.3.1	Marca Comercial.....	62
3.3.2	Tipo	63
3.3.3	Origem.....	63
3.3.4	Corantes.....	64
3.3.5	Aromas	64
3.3.6	Antioxidantes	64
3.3.7	Edulcorantes.....	65
3.3.8	Teor de álcool.....	65
3.3.9	Cor	65
3.3.10	Sumos.....	66
3.3.11	“Outros Aditivos”	66
3.4	Efeito do método.....	67
3.5	Efeito do padrão	69
4.	Conclusões.....	71
5.	Bibliografia	75
6.	Anexos	Suplemento
	Anexo A (dados experimentais relativos ao método FRAP a vários tempos)	Suplemento
	Anexo B (dados estatísticos relativos aos efeito da amostra).....	Suplemento
	Anexo C (dados estatísticos relativos aos efeito do método).....	Suplemento
	Anexo D (dados estatísticos relativos aos efeito do padrão)	Suplemento

Índice de Figuras

Figura 1 – Fabricação de cerveja pelos Egípcios.....	3
Figura 2 - Matérias-Primas usadas na produção da cerveja.....	4
Figura 3 - Célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em imagem tridimensional.	5
Figura 4 – Produção de Cerveja.....	7
Figura 5 – Espécies reactivas de oxigénio, processos de formação de radicais, consequências, alvos e agentes causadores de lesão no ADN e suas bases.....	10
Figura 6 - Reacção genérica relativa ao método TRAP.....	12
Figura 7 – Redução do radical ABTS [•] a ABTS ²⁻	13
Figura 8 - Estrutura do radical DPPH.	13
Figura 9 – Redução do Fe(III) a Fe(II) no método FRAP	14
Figura 10 – Redução do Cu(II) a Cu(I).....	14
Figura 11 – Reacção genérica relativa ao método ORAC.....	15
Figura 12 - Distribuição percentual das amostras por marca comercial.....	28
Figura 13 - Distribuição percentual das amostras para os diferentes tipos de cerveja.....	29
Figura 14 - Distribuição percentual das amostras para as diferentes origens.....	30
Figura 15 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de corante.	30
Figura 16 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de aromas.	31
Figura 17 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de antioxidantes.	32
Figura 18 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de edulcorantes.....	32

Figura 19 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de acidificantes.	33
Figura 20 - Distribuição percentual das amostras relativa ao teor de álcool.....	34
Figura 21 - Distribuição percentual das amostras relativa à cor.....	35
Figura 22 - Distribuição percentual das amostras relativa ao sumo adicionado.....	36
Figura 23 - Distribuição percentual das amostras relativa aos aditivos adicionados.....	36
Figura 24 - Valores de CA obtidos pelo método TRAP e agrupados de acordo com vários factores.	39
Figura 25 - Valores de CA obtidos pelo método TRAP e agrupados de acordo com vários factores.	40
Figura 26 - Valores de CA obtidos pelo método TEAC e agrupados de acordo com vários factores.	43
Figura 27 - Valores de CA obtidos pelo método TEAC e agrupados de acordo com vários factores.	44
Figura 28 - Valores de CA obtidos pelo método DPPH e agrupados de acordo com vários factores.	47
Figura 29 - Valores de CA obtidos pelo método DPPH e agrupados de acordo com vários factores.	48
Figura 30 – Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão AA.	49
Figura 31 - Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão AG.....	49
Figura 32 - Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão TR.....	50
Figura 33 - Valores de CA obtidos pelo método FRAP e agrupados de acordo com vários factores.	52

Figura 34 - Valores de CA obtidos pelo método FRAP e agrupados de acordo com vários factores.....	53
Figura 35 - Valores de CA obtidos pelo método CUPRAC e agrupados de acordo com vários factores.....	56
Figura 36 - Valores de CA obtidos pelo método CUPRAC e agrupados de acordo com vários factores.....	57
Figura 37 - Valores de CA obtidos pelo método ORAC e agrupados de acordo com vários factores.....	60
Figura 38 - Valores de CA obtidos pelo método ORAC e agrupados de acordo com vários factores.....	61
Figura 39 – Caixa de bigodes de valores de CA para os métodos estudados com os padrões AA, AG e TR.....	68
Figura 40 – Caixa de bigodes de valores de CA para os padrões estudados com os métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Possíveis efeitos benéficos do consumo da cerveja relativamente a algumas doenças.....	9
Tabela 2 – Resumo das reacções que ocorrem nos vários métodos testados.....	12
Tabela 3 - Reagentes utilizados por método.	20
Tabela 4 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa para as diferentes marcas comerciais estudadas.	28
Tabela 5 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa para os diferentes tipos de cerveja.	29
Tabela 6 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa às diferentes origens.	29
Tabela 7 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de corante.	30
Tabela 8 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de aromas.....	31
Tabela 9 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de antioxidantes.	31
Tabela 10 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de edulcorantes.	32
Tabela 11 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de acidificantes.	33
Tabela 12 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa ao teor de álcool.....	34
Tabela 13 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à cor.	35

Tabela 14 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa ao sumo adicionado.....	35
Tabela 15 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa aos aditivos adicionados.....	36
Tabela 16 – CA das amostras pelo método TRAP para os padrões AA, AG e TR.....	38
Tabela 17 – CA das amostras pelo método TEAC para os padrões AA, AG e TR.....	42
Tabela 18 – CA das amostras pelo método DPPH para os padrões AA, AG e TR.....	46
Tabela 19 – CA das amostras pelo método FRAP para os padrões AA, AG e TR para o tempo 180 minutos.....	51
Tabela 20 – CA das amostras pelo método CUPRAC para os padrões AA, AG e TR.....	55
Tabela 21 – CA das amostras pelo método ORAC para os padrões AA, AG e TR.....	59

Abreviaturas

AA	Ácido Ascórbico
AAPH	2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina)
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazonlina-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido Gálico
AH	Antioxidante
ATP	Adenosina tri-fosfato
CA	Capacidade Antioxidante
CUPRAC	Do inglês, <i>Cupric Reducing Antioxidant Capacity</i>
DPPH	2,2-Difenil-1-picahidrazina
ET	Transferência de electrões
FRAP	Do inglês, <i>Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter</i>
HAT	Transferência de átomo de hidrogénio
K	Potássio
ND	Não detectável
ORAC	Do inglês, <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
Sig.	Sigma
RNS	Do inglês, Reactive nitrogen species
ROS	Do inglês, Reactive oxygen species
TEAC	Do inglês, <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TPTZ	2,4,6-Tri (2-piridil) - 1,3,5-triazina
TR ou trolox	Acido 6-hidroxi-2,5,7,8 – tetrametilcroman.2-carboxílico
TRAP	Do inglês, <i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>

1. Introdução

1.1 Cerveja

A palavra cerveja provém do latim “*cervesia*”, designação específica de bebida fermentada. A expressão “*cervesia bibere*” em que “*bibere*” significa para beber e deve ter dado origem às palavras que designam a cerveja noutras línguas europeias, tais como *bière, bier, beer* [1].

1.1.1 História

O mais antigo conhecimento de uma bebida fermentada feita à base de cereais, o antepassado da cerveja dos nossos dias, surge com os sumérios 6000 a.C. [1]. Mais tarde, os Babilónios (3000 a.C.) deixaram vários testemunhos de uma indústria cervejeira. Também para os Egípcios a cerveja foi importante, sendo uma bebida do povo e dos reis, figurando nos tesouros dos sarcófagos mais notáveis (Figura 1). Foi, bem mais tarde, o domínio do povo Romano que espalhou a cerveja pela Europa, na sequência da proibição do cultivo da vinha em terrenos onde pudessem ser semeados cereais.

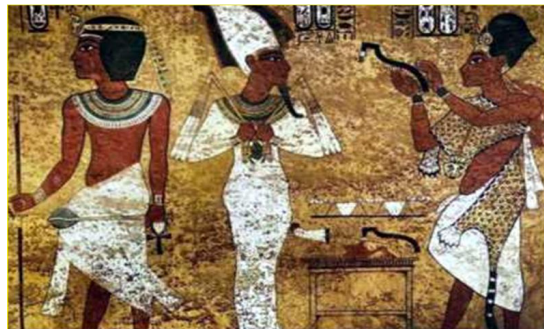


Figura 1 – Fabricação de cerveja pelos Egípcios [2].

Naturalmente, a cerveja teve diferentes caracterizações ao longo dos anos. Começando por ser uma actividade familiar, passou, pouco a pouco, a ser levada a cabo por artesãos cervejeiros que trabalhavam principalmente em abadias, em mosteiros e para grandes senhores. A partir do século XII surgiram pequenas fábricas que proliferaram na Europa Central [1].

Em Portugal o início do consumo da cerveja parece datar do século XVII. O sucesso desta bebida originou o aparecimento de sete fábricas de cerveja na cidade do Porto, em 1801. Mais tarde, em 1834 instala-se em Lisboa a Fábrica da Cerveja da Trindade. As fábricas de cerveja então existentes fundiram-se ao longo dos tempos, dando origem à actual União Cervejeira (UNICER), no Porto, e à CENTRALCER, em Lisboa [1].

1.1.2 Matérias-Primas

As matérias-primas usadas genericamente na produção da cerveja são, água, malte, cereais não maltados, lúpulo e levedura (Figura 2).

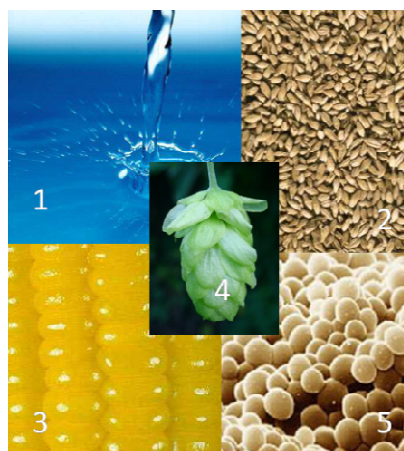


Figura 2- Matérias-Primas usadas na produção da cerveja: 1-água, 2-malte, 3-cereais não maltados, 4-Lúpulo, e 5-leveduras.

A maior parte das cervejas contém 90-95% de água. A qualidade e a composição mineral da água são por isso muito importantes para o cervejeiro, certos constituintes como magnésio, sódio, cloretos e sulfatos podem influenciar directamente o gosto da cerveja [3].

O malte é uma matéria-prima resultante da germinação de um cereal, normalmente a cevada [6]. O malte de cevada é a principal fonte de extracto e de enzimas para a obtenção dos açúcares fermentescíveis usados na produção de cerveja. É fonte de nutrientes para o crescimento da levedura, sendo responsável pela cor da cerveja e pela produção de proteínas envolvidas na formação da espuma [3].

Os cereais não maltados (arroz, milho, cevada e trigo) conferem à cerveja menos cor e características específicas, de acordo com o cereal escolhido [3].

O lúpulo é utilizado para conferir amargor e aroma à cerveja, pois apresenta grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais. Conforme a quantidade de resinas e óleos essenciais as variedades de lúpulo são classificadas em variedades de amargo e variedades de aroma [3]. Para além das qualidades enumeradas, também lhe são atribuídas outras propriedades benéficas: contribui para uma maior resistência a contaminações microbiológicas pelo seu poder anti-séptico, abre o apetite e fortalece o sistema nervoso [7].

As leveduras são microrganismos unicelulares, biologicamente classificados como fungos e que têm excelente capacidade natural de sobrevivência na ausência de oxigénio. Na presença de ar, os microrganismos multiplicam-se mas, na ausência de oxigénio, fermentam os açúcares, transformando-os em álcool. As leveduras mais usadas

na produção da cerveja são do género *Saccharomyces*. Dependendo do tipo de cerveja que se pretende produzir utilizam-se diferentes leveduras: leveduras de fermentação alta (*Saccharomyces cerevisiae* – Figura 3, típicas das Ale) e leveduras de fermentação baixa (*Saccharomyces uvarum*, antes conhecidas por *Saccharomyces carlsbergensis*, típicas das Lager) [7].

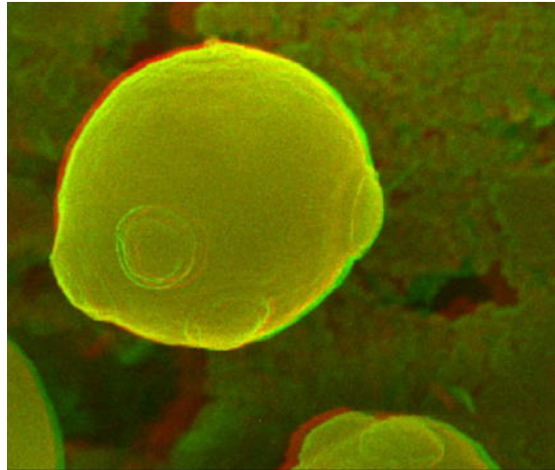


Figura 3 - Célula de *Saccharomyces cerevisiae* em imagem tridimensional.

1.1.3 Processo Produtivo

São várias as fases envolvidas na produção de cerveja (Figura 4). O processo produtivo da cerveja inicia-se com a maltagem, que consiste em três passos distintos: maceração, germinação e secagem. A maceração consiste em fornecer aos cereais o grau de humidade suficiente para a germinação, para isso os grãos de cevada são macerados em água até atingirem um teor de humidade de 43-46%. Durante as germinações são produzidas enzimas que quebram as paredes celulares tornando o grão, inicialmente rijo, friável. A germinação torna possível a transformação do amido em açúcares fermentescíveis (maltose e glucose). O processo de maltagem termina com a secagem, cujo propósito é paralisar a actividade biológica da germinação, coloração do malte e redução da humidade a um nível ideal para garantir a armazenagem [6].

O passo seguinte consiste na fabricação do mosto, processo que consiste nas seguintes etapas: moagem, brassagem, filtração, ebulição, clarificação e arrefecimento. A moagem consiste na extracção do amido, facilitando o ataque enzimático. Na brassagem, o cereal, previamente triturado, é misturado com água sob condições controladas de tempo e temperatura; as enzimas do malte degradam o amido (amilases) e proteínas (proteases) em açúcares fermentescíveis e aminoácidos necessários para o metabolismo da levedura. Todo o produto resultante da brassagem é filtrado separando-se deste modo o *drêche* (casca do cereal praticamente esgotada) do mosto. Seguidamente, a ebulição

garante a esterilização do mosto, promove a coagulação de proteínas e polifenóis, possibilita extração e isomerização dos α -ácidos do lúpulo e garante a eliminação de substâncias voláteis indesejáveis. Durante a clarificação, há a separação dos resíduos do lúpulo e das proteínas coaguladas do mosto lupulado. O mosto é arrefecido à temperatura de início de fermentação e arejado para satisfazer as necessidades da levedura em oxigênio, nutriente fundamental para a reconstituição da parede da célula e seu crescimento [3].

Após o arrefecimento do mosto adiciona-se uma levedura, que irá depender do tipo de cerveja pretendido, a temperatura controlada. A ação metabólica da levedura transforma os açúcares do mosto em etanol e dióxido de carbono. São também produzidos outros metabolitos que, embora presentes em pequenas quantidades, contribuem decisivamente para o aroma da cerveja, tais como aldeídos, álcoois superiores e estéres. Este processo denomina-se por fermentação [3].

Na maturação, fase subsequente à fermentação, a cerveja “verde” é deixada a maturar, havendo libertação dos componentes voláteis indesejáveis ao aroma/gosto final da cerveja. Posteriormente, a cerveja é filtrada, por um processo mecânico de retenção de sólidos, de modo a ficar clara e brilhante [3].

Dependendo do modo de acondicionamento da cerveja esta pode ter que ser previamente pasteurizada: se a cerveja for embalada em barris terá que ser submetida a pasteurização “flash” ou a filtração estéril; se for acondicionada em garrafas ou latas a cerveja pode ser acondicionada por enchimento asséptico com pasteurização “flash” ou filtração estéril prévia ou pasteurização “túnel” após enchimento [3].

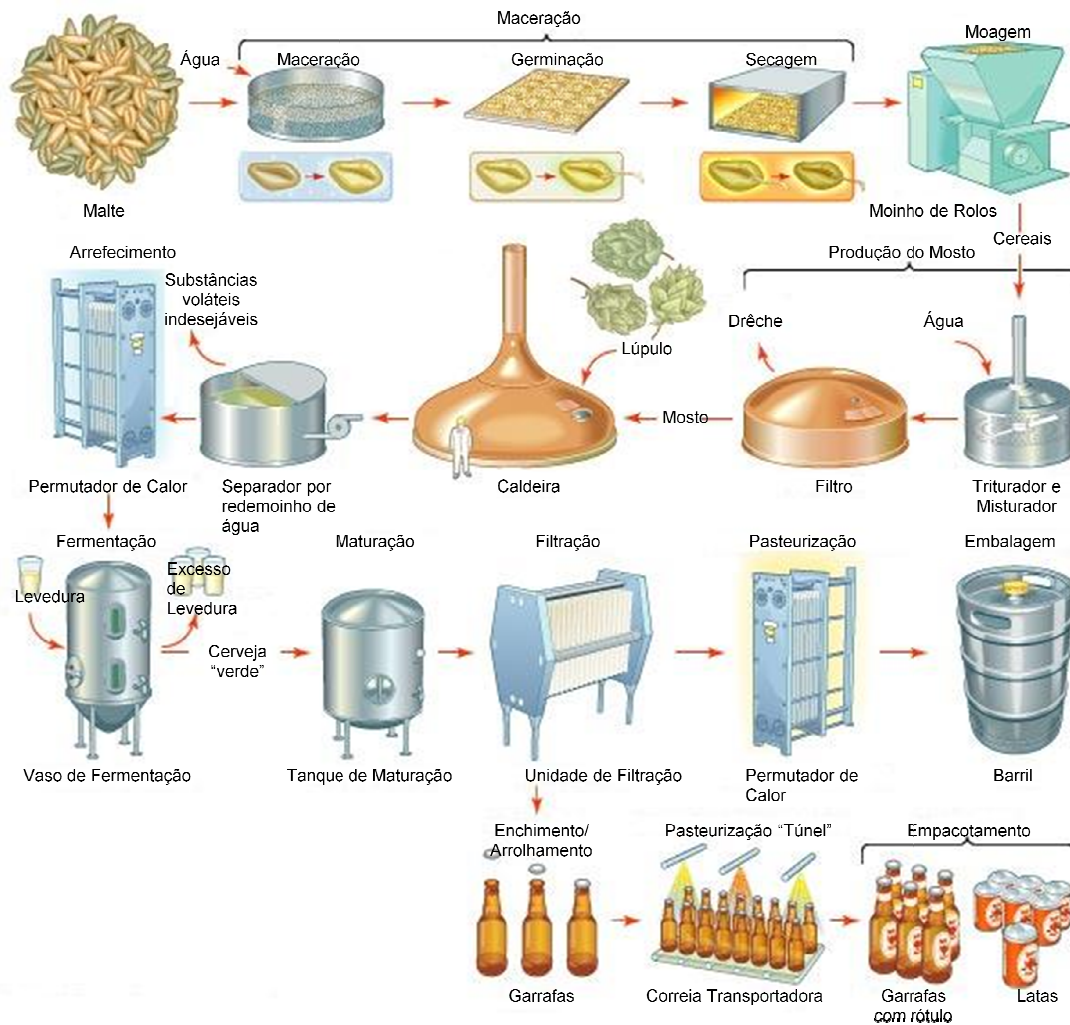


Figura 4 – Produção de Cerveja (adaptado de [8]).

1.1.4 Classificação genérica da Cerveja

As cervejas podem classificar-se em *ale* ou *lager*, consoante o tipo de fermentação a que são sujeitas. As cervejas tipo *ale* são fabricadas por meio de fermentação “superficial” ou “alta”, isto é, as leveduras ficam, tipicamente, à superfície. A temperatura de fermentação está compreendida entre os 15 e os 25°C. Apresentam pronunciado sabor a lúpulo e teor alcoólico, entre 4 e 8% [6]. Alguns exemplos de cervejas *ale* são (i) a *Porter* – muito escura, encorpada, com pronunciado sabor a malte [6]; e (ii) a *Stout* – menos escura que a *Porter*, mas com maior teor de álcool (5-6,5%) [6].

As cervejas de tipo *lager* são fabricadas por meio de fermentação “profunda” ou “baixa”, isto é, as leveduras ficam no fundo. A temperatura de fermentação está compreendida entre os 5 e os 10°C e são as mais comuns em todo o mundo [6]. Alguns exemplos de cervejas tipo *lager* são (i) a *Dortmund* – cor clara, sabor a lúpulo moderado e baixo teor alcoólico (3-3,8%), é das cervejas mais expandidas pela Europa; (ii) a *Pilsen* – Semelhante à *Dortmund* mas mais amarga; (iii) a *Bock* – é mais “pesada” e apresenta

maior teor alcoólico do que as anteriores; (iv) *Munique* – de cor mais escura do que as anteriores.

1.2 Cerveja e a saúde

As aplicações da cerveja na área da saúde têm sido as mais diversas ao longo dos tempos, encontrando-se na literatura seguintes registos da sua utilização [3],

Sumérios	- Chagas
Egípcios	- Antídoto contra venenos de cobras e escorpiões
	- Dores abdominais/ Prisão de ventre
	- Tosse
Hipócrates	- Diurético, Laxativo, Sedativo
Monges Alemães	- Dermatites e doenças pulmonares
Martin Luther	- Pedra do rim
Paracelsus	- Gota
	- Doenças gastrointestinais
Século XVIII	- Raquitismo
Lung 1946	- Efeito bacteriostático
Schmid 1950	- Tuberculose

O seu consumo moderado pode trazer benefícios para a saúde humana uma vez que se trata de uma bebida natural, pouco calórica, sem gorduras e com uma quantidade apreciável de vitaminas e proteínas [4]. O lúpulo é um sedativo suave e estimulante do apetite, o malte proporciona à cerveja ácidos orgânicos e vitaminas importantes para a saúde e a água o seu constituinte em maior quantidade torna a rica em minerais, para além de lhe conferir um elevado poder refrescante [4].

Em suma, comparativamente a outras bebidas alcoólicas, a cerveja tem um maior valor nutricional, contendo minerais e alguns nutrientes essenciais ao organismo, tais como, potássio, magnésio, cálcio e sódio. As bebidas destiladas apresentam tipicamente valores nulos nestes constituintes [5].

O consumo de cerveja tornou-se um hábito nos dias de hoje, sobretudo durante o Verão. As estatísticas indicam que, em Portugal, cada habitante consome 61,1 litros desta bebida por ano. Os seus consumidores preferenciais são, ainda, do sexo masculino. Por ser uma bebida alcoólica, o seu consumo em excesso está habitualmente

associado ao aumento do perímetro abdominal e outros sintomas menos benéficos. O seu consumo moderado pode, porém, trazer alguns benefícios (Tabela 1).

Tabela 1 – Possíveis efeitos benéficos do consumo da cerveja relativamente a algumas doenças [4].

Doença	Benefício	Forma de actuação
Hipertensão	Baixo teor em Na ⁺	O consumo moderado de cerveja provoca um deslocamento dos electrólitos (Mg ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ e Ca ²⁺) no sangue e na urina. Quanto maior quantidade de urina expulsa maior será a perda de Na ⁺ . Os níveis de K ⁺ e de Mg ²⁺ não são afectados.
Problemas no sistema circulatório	Ácido fólico	A concentração de homocisteína nos consumidores de cerveja é significativamente mais baixa que nos consumidores de vinho e licores, devido ao conteúdo de ácido fólico existente na cerveja.
Problemas do Coração	Aumento do HDL	Aumenta os valores do HDL (vulgarmente conhecido como “colesterol bom”) diminuindo o risco de doenças cardiovasculares.
Cancro	Actividade antioxidante	Os antioxidantes presentes na cerveja impedem o crescimento de células tumorais.
Obesidade		O álcool tem um efeito repressivo sobre o metabolismo da gordura. Poucas calorias.

Um possível benefício decorrente do consumo da cerveja, e ainda não estudado, pode derivar da presença de produtos naturais, extraídos dos cereais, e que apresentam propriedades antioxidantes.

Os antioxidantes são substâncias que bloqueiam danos provocados por radicais, impedindo a oxidação ou inibindo reacções promovidas pelo oxigénio por peróxidos ou

por outras espécies radicalares existentes a nível biológico. A intensidade deste efeito depende da estrutura química e da concentração de antioxidante em causa. Em matrizes complexas, a medida desta intensidade é realizada através da quantificação da CA da amostra. São usados em diversos produtos como alimentos, lubrificantes e cosméticos.

1.3 Capacidade Antioxidante

A CA é a medida da quantidade de um dado radical livre desactivado numa solução teste e pode constituir um indicador do grau de protecção exercido contra o dano oxidativo celular promovido por radicais livres. Os radicais livres são gerados a nível biológico, durante a produção de ATP na mitocôndria, por adição ou perda de um electrão. Durante este processo (Figura 5) há a produção de espécies reactivas de oxigénio [9]. Essas espécies reactivas são, tipicamente, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical peróxilo (ROO^{\cdot}), o radical hidroxilo (HO^{\cdot}), o singuleto de oxigénio (1O_2) e o peroxinitrilo ($ONOO^{\cdot}$) [10].

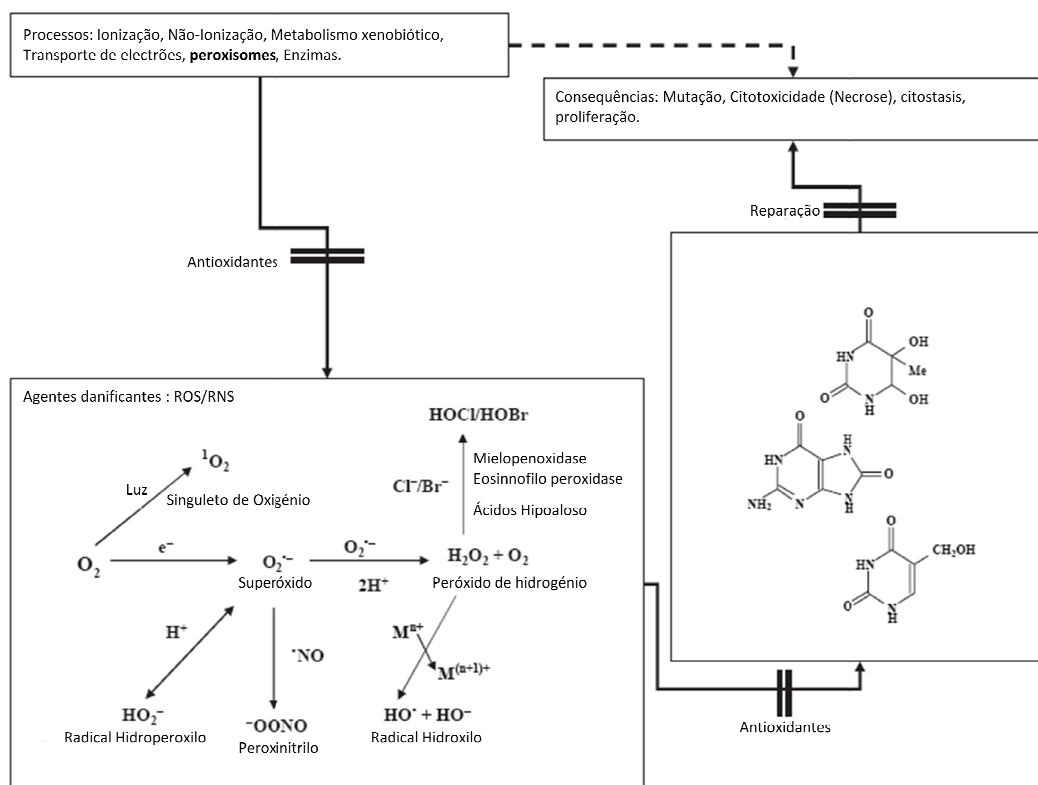


Figura 5 – Espécies reactivas de oxigénio, processos de formação de radicais, consequências, alvos e agentes causadores de lesão no ADN e suas bases (adaptado de [10]).

Estes radicais têm efeitos benéficos a nível celular, sendo conhecidos por ter um papel crucial na fagocitose e na transdução do ADN. Podem, contudo, apresentar efeitos nocivos para os tecidos biológicos, uma vez que os radicais livres podem influenciar directamente o crescimento das células e o seu desenvolvimento, aumentando a patogénese arteriosclerose, cancro, envelhecimento, entre outras doenças [11].

Os danos causados pelos radicais livres podem ser prevenidos através das três estratégias dietéticas nomeadamente: (i) restrição calórica, impedindo o desenvolvimento normal de radicais livres no metabolismo; (ii) minimização da ingestão de gorduras polinsaturadas, responsáveis pelo aumento do desenvolvimento de radicais livres; (iii) e ingestão suplementar de um ou mais antioxidantes [11]. Vários componentes com propriedades antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E carotenóides podem ser encontrados em vários produtos alimentares e têm sido indicados como tendo efeitos no controlo do dano oxidativo celular [11].

A nível bioquímico, é inquestionável o dano oxidativo causado pelos radicais livres no ADN. Apesar de não haver prova científica, tem-se verificado que dietas ricas em frutas e vegetais podem diminuir o dano oxidativo do ADN e a incidência de cancro [11].

Nem todos os antioxidantes apresentam, porém, o mesmo potencial de contribuir para este efeito, pelo que a contribuição destes constituintes numa base alimentar deve ser avaliada em função da CA conferida aos alimentos.

1.4 Determinação da Capacidade Antioxidante

A CA é a medida da quantidade de um dado radical livre desactivado numa solução teste. Existem vários métodos descritos na literatura para este efeito. Os métodos baseados em transferência de electrões (ET) envolvem uma reacção de redução e os métodos baseados em transferência de átomos de hidrogénio (HAT) monitorizam reacções cinéticas competitivas e a sua quantificação deriva de curvas cinéticas. Na Tabela 2 indicam-se as reacções que ocorrem em métodos vulgarmente referenciados na determinação da CA.

Tabela 2 – Resumo das reacções que ocorrem nos vários métodos testados - (Adaptado de [12]).

Reacções	Métodos
Métodos que envolvem reacções de transferência de átomos de hidrogénio. $ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$	ORAC TRAP
Métodos que envolvem reacções de transferência de electrões. $M(n) + e(do AH) \rightarrow AH^{\bullet} + M(n-1)$	TEAC FRAP DPPH CUPRAC

AH – Antioxidante

1.4.1 TRAP, *Total radical trapping antioxidant parameter*

O método TRAP é baseado na formação de radicais peróxido por ataque de compostos azo a um dado substrato. Tipicamente os radicais peróxido têm energia suficiente para extrair o hidrogénio do substrato [9]. Quando se adiciona a solução do composto azo, 2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina) (AAPH), à solução de substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazonlina-6-ácido sulfónico) (ABTS) há formação de catiões do radical ABTS.

O radical formado confere uma coloração azul à solução, que na presença de agentes redutores (antioxidantes), se torna incolor, havendo uma redução do radical por parte dos antioxidantes, Figura 6 [12]. O curso desta reacção pode ser acompanhado por espectrofotometria na região visível (734 nm).

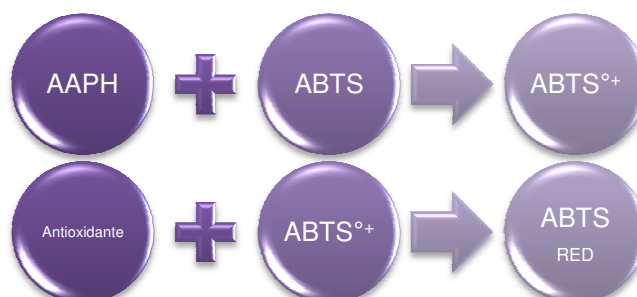


Figura 6 - Reacção genérica relativa ao método TRAP.

1.4.2 TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity

Este método é baseado na transferência de electrões, e é normalmente aplicado a amostras alimentares, devido à sua simplicidade [12]. O método consiste na monitorização do decaimento do radical ABTS ($ABTS^{\bullet}$) pela oxidação do $ABTS^{2-}$, causada pela adição da amostra que contém antioxidantes (Figura 7). O ABTS absorve a 734 nm.

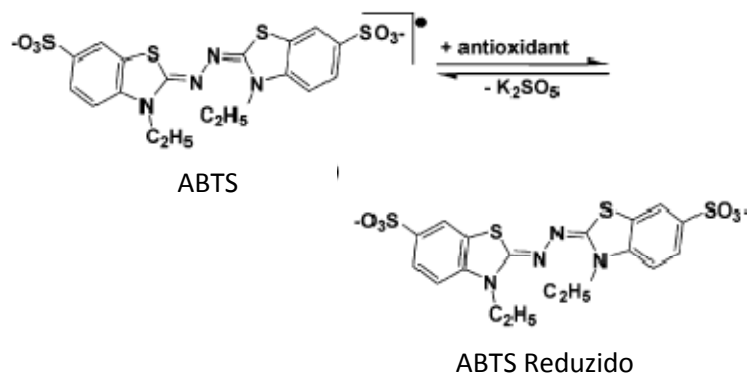


Figura 7 – Redução do radical $ABTS^{\bullet}$ a $ABTS^{2-}$ [12].

1.4.3 DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina

O DPPH (2,2-Difenil-1-picahidrazina em etanol) é um dos poucos radicais orgânicos de nitrogénio estáveis e comercialmente disponíveis. A presença do electrão de azoto na molécula de DPPH (Figura 8) confere-lhe uma coloração roxa, que se torna incolor quando se encontra na presença de agentes redutores [12].

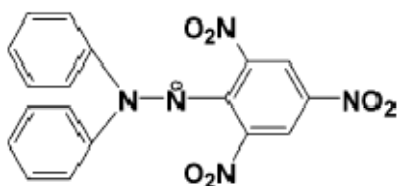


Figura 8 - Estrutura do radical DPPH.

O método DPPH é simples mas algumas desvantagens limitam a sua aplicação. Muitos antioxidantes que reagem rapidamente com radicais peróxido podem ter uma reacção muito lenta ou mesmo serem inertes ao DPPH [12].

1.4.4 FRAP, Ferric reducing antioxidant power

O método FRAP mede a capacidade de redução da amostra [13]. Este método é baseado na transferência de elétrons, utilizando o $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ como um agente oxidante. O FRAP avalia a redução do complexo Fe(III) a Fe(II) (Figura 9), que ocorre devido à presença de agentes redutores (antioxidantes). O complexo Fe(II)(TPTZ)_2 tem uma coloração roxa e a sua absorvância é lida a 593 nm ao longo do tempo, porque a absorvância aumenta lentamente ao longo de várias horas [12].

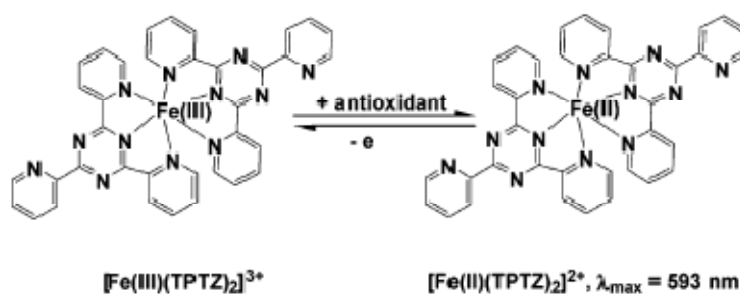


Figura 9 – Redução do Fe(III) a Fe(II) no método FRAP [12].

Sendo o potencial de redução do Fe(III) comparável com o de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, não há muitas diferenças entre este método e o método TEAC, com a exceção de que o TEAC é levado a cabo a pH neutro e o FRAP é realizado a pH ácido.

1.4.5 CUPRAC, Reducing antioxidant capacity

Este método é baseado na redução de Cu(II) a Cu(I) pelos antioxidantes presentes na amostra (Figura 10). O complexo cobre - neocupraína $[\text{Cu(II)-Nc}]$ é reduzido a Cu(Nc)_2^+ na presença de antioxidantes, apresentando o complexo formado uma coloração de absorção máxima a 450 nm [14].

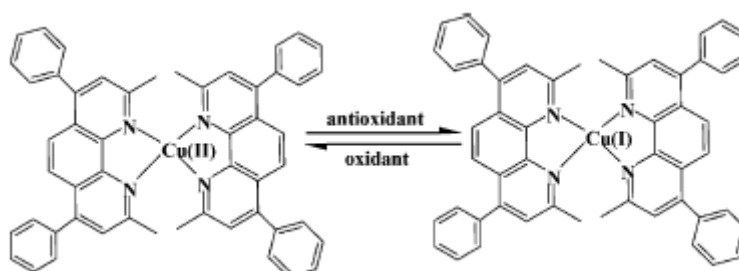


Figura 10 – Redução do Cu(II) a Cu(I) [12].

Tem várias vantagens relativamente a outros métodos baseados na transferência de electrões, nomeadamente a simplicidade, estabilidade dos reagentes e reprodutibilidade [14].

1.4.6 ORAC, *Oxygen radical absorbance capacity*

Este método permite determinar a capacidade de absorção de radicais de oxigénio e baseia-se na transferência de átomos de hidrogénio [15]. Mede a diminuição da emissão da fluorescência. Neste método o radical AAPH formado reage com o oxigénio rapidamente dando origem a um radical peróxido mais estável (ROO^{\bullet}). Na presença de antioxidantes o ROO^{\bullet} atrai um átomo de hidrogénio do antioxidante para formar hidroperóxido (ROOH) e um radical do antioxidante estável, Figura 11 [15]. Na ausência de antioxidantes, o radical promove a oxidação da fluoresceína, originando um decaimento no sinal medido.

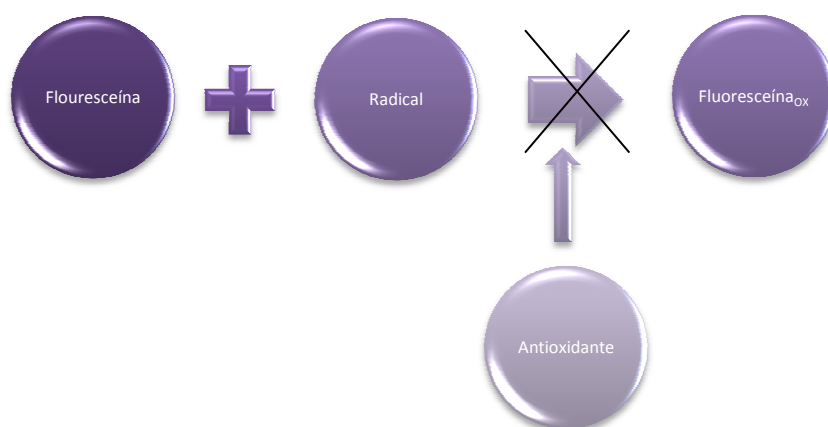


Figura 11 – Reacção genérica relativa ao método ORAC.

O ORAC combina o tempo e percentagem de inibição da acção do radical pelo antioxidante e usa a área sob a curva (AUC – *Area under the curve*, do inglês) para a quantificação do efeito protector do antioxidante [16].

De uma forma geral, todos estes métodos são baseados em reacções químicas semelhantes, mas diferentes. Considerando que estes são utilizados para o cálculo de CA em amostras de composição complexa e desconhecida, o grau de acção antioxidante exercido por um dado constituinte pode ser diferente em cada um dos métodos. Neste sentido, e com o objectivo de avaliar a CA potencial em cada cerveja, poderá ser relevante a avaliação deste parâmetro com base em métodos diferentes.

2. Parte Experimental

2.1 Considerações Gerais

Neste ponto referem-se todas as metodologias, materiais, reagentes e equipamentos utilizados na quantificação da CA da cerveja.

2.2 Equipamento e Material

Na preparação das soluções usaram-se balões volumétricos de classe A com capacidades compreendidas entre 10,00 e 2000,0 mL. Os volumes rigorosos inferiores a 5,0 mL foram medidos com os modelos P20, P100, P1000 e P5000 de pipetas automáticas da marca Gilson[®]; os volumes superiores a 5,0 mL foram medidos com pipetas volumétricas de vidro classe A.

O espectrofotómetro utilizado para as leituras de absorvância foi um Shimadzu UV-2102PC e o espectrofluorímetro utilizado nas leituras de fluorescência foi um AvaSpec 2048 com lâmpada de Xénon pulsada. As amostras foram colocadas em cuvetes com 1 cm de percurso óptico. As leituras de absorção ou de emissão foram efectuadas a 180° ou a 90° relativamente à fonte de radiação, pelo que as cuvetes utilizadas apresentavam, respectivamente, 2 ou 4 faces polidas.

Os reagentes sólidos foram pesados numa balança analítica ($\pm 10^{-6}$ g) de marca Sartorius, modelo BP 211 D. Utilizou-se um banho termostatzado e banho de ultrasons de marca Fungilab, com capacidade 5,7 L e com regulação de tempo e temperatura.

Para controlar e ajustar o pH utilizou-se um potenciómetro de marca Crison[®], modelo pH Meter GPL 22, com eléctrodo de vidro combinado da mesma marca.

2.3 Reagentes

Na preparação das soluções aquosas utilizou-se água ultra-pura de condutividade inferior a $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$, a 25°C. As soluções aquosas concentradas foram preparadas por pesagem rigorosa dos reagentes sólidos e posterior diluição em solvente apropriado. As soluções menos concentradas foram preparadas a por diluição rigorosa das soluções anteriores. Todos os reagentes utilizados foram de qualidade p.a e encontram-se indicados na Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados por método.

Método	Reagentes
TRAP	Acetato de Sódio trihidratado e ácido acético glacial – Merck AAPH – Aldrich ABTS, TR e AG monohidratado 98% - Fluka AA – Riedel-de-Häen
TEAC	Persulfato de sódio, ABTS e TR – Fluka Ácido Fosfórico 85% - Riedel de Häen Tri – potássio fosfato 1-hidratado e AA – Riedel-de-Häen
DPPH	Acetato de sódio trihidratado e ácido acético glacial – Merck TR e AG monohidratado 98% - Fluka AA – Riedel-de-Häen DPPH – Sigma
FRAP	AA – Riedel-de-Häen TR, AG monohidratado 98% e TPTZ - Fluka Acetato de sódio trihidratado, cloreto de ferro (III) hexahidratado, ácido acético glacial – Merck Ácido clorídrico – Carlo Erba
CUPRAC	AA – Riedel-de-Häen TR, AG monohidratado 98% - Fluka Acetato de amônio – Merck Neocuprainá – Sigma Cloreto de cobre (II) – M&B
ORAC	AA – Riedel-de-Häen TR, AG monohidratado 98% - Fluka Fosfato de potássio - Riedel-de-Häen Ácido fosfórico - Riedel-de-Häen AAPH – Aldrich Fluoresceína - Riedel-de-Häen

2.4 Amostras

Foram analisadas 27 cervejas diferentes adquiridas no comércio local. As denominações comerciais correspondentes foram:

- Super Bock: Tango, Green, Limão, Sem Álcool, Pêssego, Sabor Autêntico, Abadia, Stout e Preta.
- Sagres: “normal”, Preta, Bohémia D’ouro, Bohémia e Zero.
- Grimbergen: Cuvée de L’Ermitage, Optimo Bruno, Tripel, Double, Blond.
- Leffe: Blonde, Radiense, Brune, Vieille Luvée.
- Imperial, Auchan, Jumbo e Tagus.

2.5 Procedimentos

2.5.1 TRAP, *Total radical trapping antioxidant parameter*

Preparou-se uma solução denominada “Solução TRAP”, que continha 75 μM de ABTS e 2 mM de AAPH, dissolvidos em 50 mM de solução tampão de acetato de sódio, pH 4,3. Esta solução foi incubada a 45°C, durante 60 minutos, sendo posteriormente arrefecida à temperatura ambiente. Numa cuvete juntaram-se 2400 μL de “Solução TRAP” com 800 μL de amostra. O valor de absorvância correspondente foi medido, 15 minutos depois, a 734 nm.

O valor de CA das amostras foi obtido por comparação com soluções padrão de AA, TR e AG, recorrendo a curvas de calibração. Os intervalos de concentração utilizados foram 1,3 a 35 μM para os padrões AA e TR, para o padrão AG o intervalo de concentrações foi de 1,3 a 10 μM . A regressão linear de cada curva de calibração foi utilizada para calcular a CA das amostras, sendo esta expressa em concentração relativa à solução padrão correspondente.

2.5.2 TEAC, *Trolox equivalent antioxidant capacity*

Preparou-se uma solução que se designou por “Solução TEAC”, contendo 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de sódio, dissolvidos em tampão fosfato de pH ~ 7 . A “Solução TEAC” foi incubada durante a noite, no escuro, verificando-se no dia seguinte a formação de uma coloração azul esverdeada muito intensa. Diluíram-se 12,5 mL desta solução em 500,0 mL de solução tampão fosfato de pH ~ 7 [13].

Na cuvete adicionaram-se 2000 μL de “Solução TEAC”, 900 μL de água e 100 μL de amostra, sendo a absorvância lida, 15 minutos após se iniciar a reacção, a 734 nm. Tal como no método anterior a regressão linear da curva de calibração relativa aos padrões AA, AG e TR permitiu determinar a CA das amostras, os intervalos de concentração utilizados neste método foram 1,7 a 46,7 μM para os padrões AA e TR e 0,7 a 13,3 μM para o padrão AG.

2.5.3 DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina

Preparou-se uma solução $1,9 \times 10^{-4}$ M de DPPH em etanol e acetato de sódio 0,1 M (pH~4,3) 2:1 (v/v), verificando-se a formação de uma coloração púrpura.

Na cuvete adicionaram-se 2800 μL da solução anterior e 200 μL de amostra. A descoloração da cor púrpura do radical DPPH foi medida a 525 nm, 10 minutos após o início da reacção. A regressão linear de cada curva de calibração permitiu determinar a CA das amostras, sendo esta expressa em concentrações das soluções padrão. Os intervalos de concentração de calibração dos padrões AA, AG e TR foram 1,7 a 50 μM para os padrões AA e TR e 3,3 a 66,7 μM para o padrão AG.

2.5.4 FRAP, *Ferric ion reducing antioxidant power*

Preparou-se uma mistura contendo 200,0 mL de solução tampão acetato, 23 mM, pH~3,6; 20,0 mL de uma solução de TPTZ, 20,0 mM; 20,0 mL de uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM e 12 mL de água desionizada. A solução de TPTZ foi dissolvida em HCl 40 mM e diluída em banho-maria a 50°C. As soluções referidas foram preparadas diariamente.

Na cuvete colocaram-se 1500 μL da mistura reaccional acima descrita, 1300 μL de tampão acetato, 30 μL de amostra e 170 μL de água desionizada. Esta mistura foi mantida a 37°C, por imersão em banho-maria. As absorvâncias foram lidas a 593 nm, de 30 em 30 minutos, até que o sinal analítico estabilizasse.

A regressão linear de cada curva de calibração permitiu determinar a CA das amostras, sendo esta expressa em concentrações das soluções padrão. Os intervalos de concentração de calibração dos padrões de AA, AG e TR foram 0,8 a 33,2 μM para os padrões AA e TR e 0,8 a 16,6 μM para o padrão AG.

2.5.5 CUPRAC, *Reducing antioxidant capacity*

Preparou-se uma solução $1,0 \times 10^{-2}$ M de cloreto de cobre (II) e uma solução tampão de acetato de amónio, com concentração 1 M e pH~7. Esta última solução foi preparada por dissolução de acetato de amónio em água. Preparou-se ainda uma solução de neocupraína $7,5 \times 10^{-3}$ M em etanol 96%. [14]

Na cuvete colocaram-se 1 mL de Cu (II), 1 mL de neocupraína, 1 mL de solução tampão e 0,1 mL de amostra. A absorvância da mistura foi lida a 450 nm, 30 minutos após o início da reacção. [14]

De modo equivalente ao indicado para outros métodos, as curvas de calibração foram traçadas com soluções padrão de AA, AG e TR, de concentrações compreendidas entre 1,2 e 61,0 μ M para os padrões AA e TR e entre 0,6 e 18,3 μ M para o padrão AG.

2.5.6 ORAC, *Oxygen radical absorbance capacity*

Foram preparadas soluções de fluoresceína de concentração 1,4 nM e de AAPH com 4,8 mM em solução tampão fosfato 75 mM, de pH 7,4.

Na cuvete colocaram-se 1,7 mL de solução de AAPH, 1 mL de solução de fluoresceína e 300 μ L de amostra diluída (3000 x). A mistura foi incubada a 37°C. As leituras foram efectuadas de 30 em 30 minutos, aos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 e 523 nm, respectivamente, até que a fluorescência obtida correspondesse a 0,5% da fluorescência inicial.

A CA foi comparada com a de soluções padrão de AA, AG e TR. O sinal analítico para cada concentração ou amostra ensaiada foi calculado através da estimativa da AUC, recorrendo à seguinte fórmula,

$$AUC = 1 + \frac{f1}{f0} + \frac{f2}{f0} + \dots + \frac{fn}{f0}$$

Em que f_0 é a fluorescência inicial lida aos zero minutos e fn é a fluorescência lida no tempo n . O valor de AUC líquido é obtido subtraindo o AUC do branco ao da amostra, sendo o valor de CA correspondente determinado da seguinte forma,

$$CA = \frac{AUC_{AMOSTRA} - AUC_{BRANCO}}{AUC_{PADRÃO} - AUC_{BRANCO}} \times \text{Molalidade}_{PADRÃO} / \text{Molalidade}_{AMOSTRA}$$

2.6 Análise estatística de resultados

Os resultados de CA obtidos foram analisados estatisticamente pelo *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 15.0). Realizou-se uma análise descritiva de todas as variáveis em estudo. A representação gráfica desta análise foi efectuada por caixas de bigodes.

A caixa de bigodes corresponde a um rectângulo onde se assinalam os *Quartis* da distribuição. Nos extremos de cada bigode posicionam-se as observações mínima e máxima. Todas as observações, para além dos bigodes, chamam-se aberrantes ou *outliers*. A caixa estende-se do 1º *Quartil* ao 3º *Quartil*, que são as observações centrais, que correspondem a 50% das observações totais. A mediana (Q2) é representada pela linha grossa dentro da caixa. Um dos bigodes prolonga-se para baixo de Q1 até à observação mínima não *outlier* e o outro bigode prolonga-se para cima de Q3 até à observação máxima não *outlier*. Os *outliers* podem representar erros na introdução de dados e nesse caso devem ser eliminados, ou fazer parte do fenómeno em estudo, sendo esse o caso devem ser mantidos [17].

O teste ANOVA univariada foi utilizado na identificação de subgrupos homogéneos entre os grupos de amostras constituídos para os factores em estudo. Uma vez que as observações eram independentes entre si, a aplicação deste teste foi possível quando os valores de CA obtidos, (i) Se encontrassem segundo uma distribuição normal; e (ii) e com variâncias entre cada grupo iguais entre si. O intervalo de confiança aplicado foi 99%.

A verificação da normalidade foi realizada através do teste de *Shapiro-Wilk*. Em alguns casos foi necessário transformar os valores de CA para obter uma distribuição normal, confirmando neste caso a normalidade para as variáveis transformadas. Por vezes a única transformação que permitia obter uma distribuição normal era a transformação de seno. Mas uma vez que o seno é uma função cíclica que varia entre -1 e 1, esta não deveria ter sido utilizada.

Existe homocedasticidade quando há variâncias iguais entre cada grupo, tendo sido através do teste de *Levene* que se verificou este pressuposto.

Por questões de simplificação de resultados, algumas tabelas com valores de CA ou de dados estatísticos relativos à verificação da normalidade e da homocedasticidade e de dados do teste ANOVA foram inseridos nos anexos à dissertação. Sempre que possível, é efectuada a referência a estas tabelas ao longo dos resultados e discussão.

Sempre que a menção da marca comercial possa colocar em causa a apreciação global da mesma, de forma positiva ou negativa, a sua designação será codificada.

3. Resultados e Discussão

No presente trabalho foram analisadas 27 amostras de cerveja diferentes. Considerando que os vários métodos descritos podem fornecer valores diferentes, optou-se pela determinação da CA com base nos métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC. O antioxidante de referência é também um aspecto a ter em conta, já que cada antioxidante apresenta uma acção antioxidante de intensidade própria. Neste sentido, os valores de CA foram expressos relativamente à concentração de antioxidantes típicos, nomeadamente AA, AG e TR.

A interpretação dos valores de CA obtidos requer, porém, uma avaliação estatística exaustiva, relativamente aos factores passíveis de influenciar a resposta experimental, que são identificáveis nas amostras comerciais e que possam justificar algumas diferenças observadas entre as amostras.

O trabalho foi, por isso, iniciado com a caracterização das amostras, seguindo-se a avaliação de CA por método e a identificação dos efeitos do método e do padrão nos valores observados.

3.1 Caracterização das amostras

De forma a caracterizar as amostras estudadas foi necessário avaliar alguns parâmetros de natureza descritiva. Os valores da variável estatística são descritos em frequências absolutas (F_i), frequência relativa e frequência relativa acumulada. As frequências absolutas indicam o número de vezes que cada variável se repete, a frequência relativa exprime o número de vezes que cada variável se repete face ao total de observações. A frequência relativa acumulada dá para cada valor da variável a frequência de observações até esse valor [17].

Os parâmetros estudados para as várias amostras foram:

- i. Marca comercial;
- ii. Tipo;
- iii. Origem;
- iv. Corantes;
- v. Aroma;
- vi. Ácido ascórbico;
- vii. Edulcorante;
- viii. Acidificante;
- ix. Teor de álcool adicionado;
- x. Cor;
- xi. Sumo adicionado;
- xii. Outros aditivos.

As 27 amostras estudadas foram de 8 marcas comerciais distintas. Na Tabela 4 encontram-se indicados os dados relativos à estatística descritiva correspondente; a coluna relativa à frequência refere-se ao número de amostras existentes de cada marca comercial (p.e., existem 9 cervejas da marca A), a frequência relativa corresponde à percentagem de amostras de cada marca comercial face ao total das amostras (p.e., a marca comercial Super Bock corresponde a 33,3 % das amostras totais) e a frequência acumulada relativa é a percentagem relativa à frequência acumulada (p.e., no caso da marca comercial Sagres a frequência relativa acumulada é a frequência relativa da sagres, 18,2 %, mais a frequência relativa da Super Bock, 33,3 %, obtendo-se uma frequência relativa acumulada de 51,9 %).

A marca comercial com maior variedade de amostras estudadas foi a Super Bock, com 9 cervejas, seguida da Sagres e Grimbergen com 5 amostras cada e da marca Leffe com 4 cervejas. Relativamente às marcas Imperial, Auchan, Jumbo e Tagus encontrou-se apenas uma amostra de cada disponível no mercado nacional (Tabela 4, Figura 12).

Tabela 4 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa para as diferentes marcas comerciais estudadas.

Marca Comercial	F_i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Super Bock	9	33,3	33,3
Sagres	5	18,5	51,9
Grimbergen	5	18,5	70,4
Leffe	4	14,8	85,2
Imperial	1	3,7	88,9
Auchan	1	3,7	92,6
Jumbo	1	3,7	96,3
Tagus	1	3,7	100
Total	27	100	



Figura 12 - Distribuição percentual das amostras por marca comercial.

As cervejas consideradas dividem-se em dois grandes grupos consoante o tipo de fermentação a que são sujeitas no processo de fabrico. De uma forma prática, diz-se que a cerveja é do tipo *ale* quando as leveduras ficam à superfície entre os 15 e 25°C e a cerveja é do tipo *lager* quando as leveduras ficam no fundo entre os 5 e 10°C (Tabela 5). Sendo que a cerveja do tipo *lager* constitui a maioria nas cervejas estudadas (55,6%) (Tabela 5, Figura 13)

Tabela 5 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa para os diferentes tipos de cerveja.

Tipo	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Ale	12	44,4	44,4
Lager	15	55,6	100
Total	27	100	

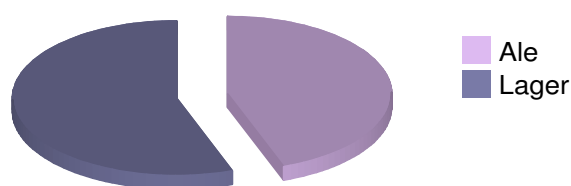


Figura 13 - Distribuição percentual das amostras para os diferentes tipos de cerveja.

As 27 amostras consideradas foram produzidas em países diferentes: Portugal e Bélgica. Naturalmente, as amostras em maior percentagem eram as portuguesas (Tabela 6, Figura 14).

Tabela 6 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa às diferentes origens.

Origem	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Portuguesa	18	66,7	66,7
Belga	9	33,3	100
Total	27	100	



Figura 14 - Distribuição percentual das amostras para as diferentes origens.

Relativamente à presença de corantes, aditivos alimentares adicionados com a intenção de corar a cerveja, a grande maioria das amostras não indicava qualquer constituinte desta natureza no rótulo comercial. Apenas 6 amostras incluíam caramelo III na sua constituição (22,2 %) (Tabela 7, Figura 15).

Tabela 7 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de corante.

Corante	F_i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Caramelo III (E150)	6	22,2	22,2
Sem corante	21	77,8	100
Total	27	100	

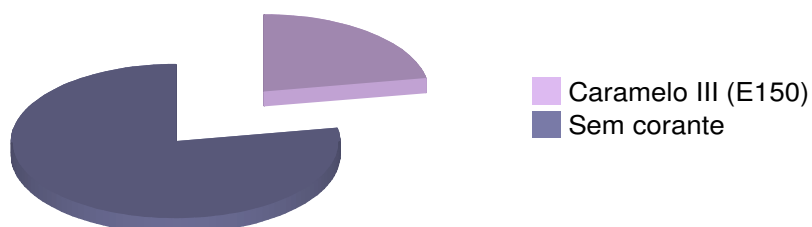


Figura 15 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de corante.

Com o objectivo de satisfazer alguns novos interesses do consumidor, têm surgido, recentemente, bebidas aromatizadas no mercado nacional. As cervejas não escaparam a esta “moda”, tendo-se encontrado algumas amostras com aromas de limão, groselha ou com combinação chocolate, café, caramelo e frutos. Naturalmente, prevalecem no mercado as cervejas sem aroma (Tabela 8, Figura 16).

Tabela 8 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de aromas.

Aroma	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Limão	2	7,4	7,4
Groselha	1	3,7	11,1
Pêssego	1	3,7	14,8
Sem aroma	22	81,5	96,3
Chocolate, café, caramelo e frutos	1	3,7	100
Total	27	100	



Figura 16 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de aromas.

Apenas 3 das 27 amostras em estudo indicaram a presença de antioxidantes, o que corresponde a 11,1 % das amostras (Tabela 9, Figura 17). O ácido ascórbico foi o antioxidante de eleição para a indústria cervejeira.

Tabela 9 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de antioxidantes.

Antioxidante	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Sem antioxidante	24	88,9	88,9
Com (Ácido Ascórbico)	3	11,1	100
Total	27	100	

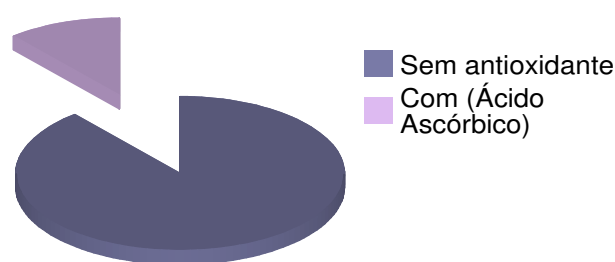


Figura 17 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de antioxidantes.

Também em resposta às necessidades do consumidor, a presença de edulcorantes em bebidas é cada vez mais frequente. Estes compostos conferem um sabor doce à bebida e não contribuem significativamente para o seu teor calórico. Os edulcorantes presentes foram o aspartamo e acesulfamo de potássio. As amostras que continham edulcorantes na sua constituição corresponderam a apenas 11,1 % das cervejas analisadas (Tabela 10, Figura 18).

Tabela 10 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de edulcorantes.

Edulcorante	F_i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Com (Aspartamo - E951 e Acesulfamo K - E950)	2	7,4	7,4
Sem Edulcorante	24	88,9	96,3
Com (Acesulfamo K - E950)	1	3,7	100
Total	27	100	

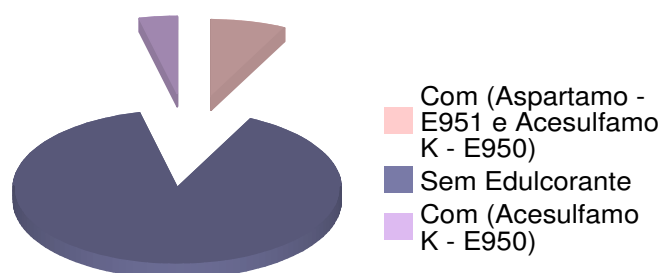


Figura 18 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de edulcorantes.

Tal como nos sumos comerciais, e sobretudo por questões organolépticas e/ou de estabilidade, a adição de um composto capaz de ajustar o carácter ácido da bebida pode ser de extrema importância. Este ajuste não é típico para cervejas, mas foi encontrada uma cerveja com ácido cítrico na sua constituição e que corresponde apenas a 3,7 % das cervejas analisadas (Tabela 11, Figura 19).

Tabela 11 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à presença de acidificantes.

Acidificante	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Com (Ácido Cítrico)	1	3,7	3,7
Sem acidificante	26	96,3	100
Total	27	100	

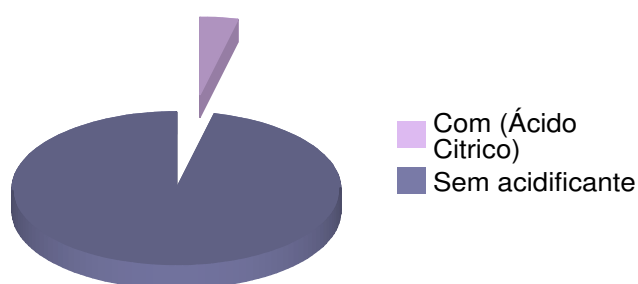


Figura 19 - Distribuição percentual das amostras relativa à presença de acidificantes.

O teor de álcool das amostras variou entre 0 % e 10 %. Considerou-se como 0 % de álcool as cervejas com a denominação “sem álcool”. As amostras apresentavam mais frequentemente 5% de álcool (Tabela 12, Figura 20).

Tabela 12 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa ao teor de álcool.

Teor de álcool (%)	F_i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
0%	5	18,5	18,5
4%	3	11,1	29,6
5%	6	22,2	51,9
6%	3	11,1	63
7%	5	18,5	81,5
8%	3	11,1	92,6
9%	1	3,7	96,3
10%	1	3,7	100
Total	27	100	



Figura 20 - Distribuição percentual das amostras relativa ao teor de álcool.

Como é de senso comum, as cervejas podem apresentar colorações diferentes. Estas variações de cor podem não estar associadas à adição de corante, mas resultarem apenas das matérias-primas utilizadas e do processo de fabricação associado, sobretudo a fase de maltagem. As amostras analisadas foram divididas de acordo com as colorações seguintes: preta, dourada, castanha avermelhada, vermelha e âmbar. As cores das cervejas foram estabelecidas por observação (Tabela 13, Figura 21).

Tabela 13 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa à cor.

Cor	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Preta	4	14,8	14,8
Dourada	11	40,7	55,6
Castanha avermelhada	5	18,5	74,1
Vermelha	3	11,1	85,2
Âmbar	4	14,8	100
Total	27	100	



Figura 21 - Distribuição percentual das amostras relativa à cor.

Apenas 3 cervejas, num universo de 27 amostras apresentavam sumo na sua constituição, o que representou 11,1 % das amostras. É importante referir que o sumo adicionado é diferente nas 3 amostras (Tabela 14, Figura 22).

Tabela 14 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa ao sumo adicionado.

Sumo	F _i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Limão e maçã (10%)	1	3,7	3,7
Limão (1%)	1	3,7	7,4
Pêssego, maçã e pêra (10%)	1	3,7	11,1
Sem sumo adicionado	24	88,9	100
Total	27	100	

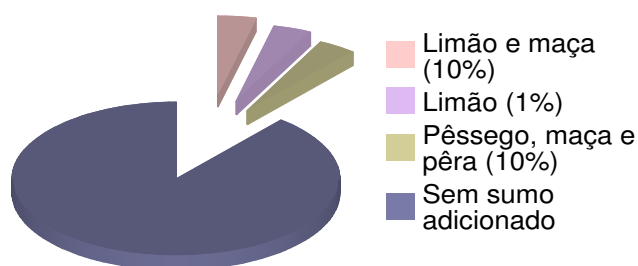


Figura 22 - Distribuição percentual das amostras relativa ao sumo adicionado.

Outros aditivos encontrados e que não se agrupavam de forma organizada foram, também, estudados. São estes o concentrado de groselha e cenouras, a frutose e o xarope de glicose. Apenas 14,8 % das amostras incluíam algum destes aditivos (Tabela 15, Figura 23).

Tabela 15 – Frequência amostral, frequência relativa e frequência acumulada relativa aos aditivos adicionados.

Outros aditivos	F_i	Frequência relativa (%)	Frequência acumulada (%)
Concentrado de groselha, cenouras e frutose	1	3,7	3,7
Xarope de Glucose	3	11,1	14,8
Sem aditivos	23	85,2	100
Total	27	100	

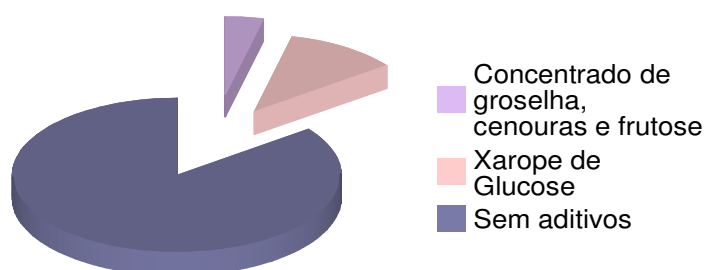


Figura 23 - Distribuição percentual das amostras relativa aos aditivos adicionados.

3.2 CA segundo o método

Os antioxidantes presentes nos alimentos e bebidas que ingerimos diariamente revestem-se de particular importância, uma vez que o ser humano não conta com nenhuma ferramenta capaz de eliminar alguns dos radicais produzidos ao nível biológico. Ao testar a CA das cervejas é possível obter informação relativa ao grau de protecção resultante da sua ingestão, contudo a sua interpretação e enquadramento dos valores nem sempre é fácil, uma vez que o resultado obtido depende da natureza do método utilizado e do antioxidante usado como padrão.

A CA das cervejas foi testada com base em diferentes métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC e em antioxidantes padrão diferentes AA, AG e TR.

3.2.1 TRAP, *Total radical trapping antioxidant parameter*

Os valores de CA obtidos segundo o método TRAP para as diferentes amostras, de acordo com o padrão utilizado, foram indicados na Tabela 16. A CA da cerveja é maior quando expressa em função do padrão TR, tendo-se obtido os menores valores de CA para o padrão AG.

Considerando todos os valores obtidos, a CA variou entre 287,5 e 2435 μM , tendo-se obtido os menores valores de CA de cada padrão na amostra 2, que corresponde a uma das cervejas da marca A e os maiores valores de CA para os vários padrões na amostra 8, que corresponde a outra cerveja da mesma marca.

Quando estes valores se encontram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figura 24 e 25. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que a marca D possuía valores de CA superiores aos restantes, seguindo-se as marcas C, B e A. As amplitudes de variação de CA foram muito elevadas para todas as marcas estudadas, sendo especialmente elevadas para a marca C. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores muito dispersos. Esta dispersão foi bem evidente nas cervejas com 5 % de álcool, o grupo de amostras com maior frequência comercial.

Genericamente, os factores origem, corante, antioxidante, acidificante e cor parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos (ver Figuras 24 e 25). A presença de edulcorante, aroma, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” contribuiu para valores de CA ligeiramente inferiores e de amplitudes de variação menores.

Tabela 16 – CA das amostras pelo método TRAP para os padrões AA, AG e TR.

Amostra nº	Concentração (μM)					
	AA		AG		TR	
1	1489,5	± 24,8	446,5	± 10,8	1754,3	± 33,2
2	1126,2	± 78,9	287,5	± 34,5	1268,1	± 105,5
3	1532,5	± 27,0	465,3	± 11,8	1811,8	± 36,2
4	1435,3	± 60,9	422,8	± 26,6	1681,8	± 81,4
5	1374,8	± 20,3	396,3	± 8,9	1600,7	± 27,1
6	1502,3	± 11,3	452,1	± 4,9	1771,3	± 15,1
7	1829,0	± 117,2	595,1	± 51,3	2208,4	± 156,8
8	1999,5	± 6,8	669,7	± 3,0	2436,6	± 9,0
9	1631,3	± 45,1	508,6	± 19,7	1944,0	± 60,3
10	1602,7	± 22,5	496,0	± 9,9	1905,7	± 30,2
11	1782,7	± 56,3	574,8	± 24,7	2146,6	± 75,4
12	1567,6	± 58,6	480,7	± 25,6	1858,7	± 78,4
13	1915,0	± 0,0	632,7	± 0,0	2323,6	± 0,0
14	1766,8	± 11,3	567,9	± 4,9	2125,3	± 15,1
15	1836,9	± 2,3	598,6	± 1,0	2219,1	± 3,0
16	1970,8	± 15,8	657,1	± 6,9	2398,2	± 21,1
17	1722,2	± 56,3	548,3	± 24,7	2065,6	± 75,4
18	1930,9	± 22,5	639,7	± 9,9	2344,9	± 30,2
19	1554,8	± 9,0	475,1	± 3,9	1841,7	± 12,1
20	1835,3	± 54,1	597,9	± 23,7	2217,0	± 72,4
21	1997,9	± 18,0	669,0	± 7,9	2434,5	± 24,1
22	1727,0	± 247,9	550,4	± 108,5	2072,0	± 331,7
23	1962,8	± 18,0	653,6	± 7,9	2387,6	± 24,1
24	1510,2	± 94,7	455,6	± 41,4	1782,0	± 126,7
25	1280,7	± 4,5	355,1	± 2,0	1474,9	± 6,0
26	1542,1	± 18,0	469,5	± 7,9	1824,6	± 24,1
27	1145,3	± 38,3	295,9	± 16,8	1293,7	± 51,3

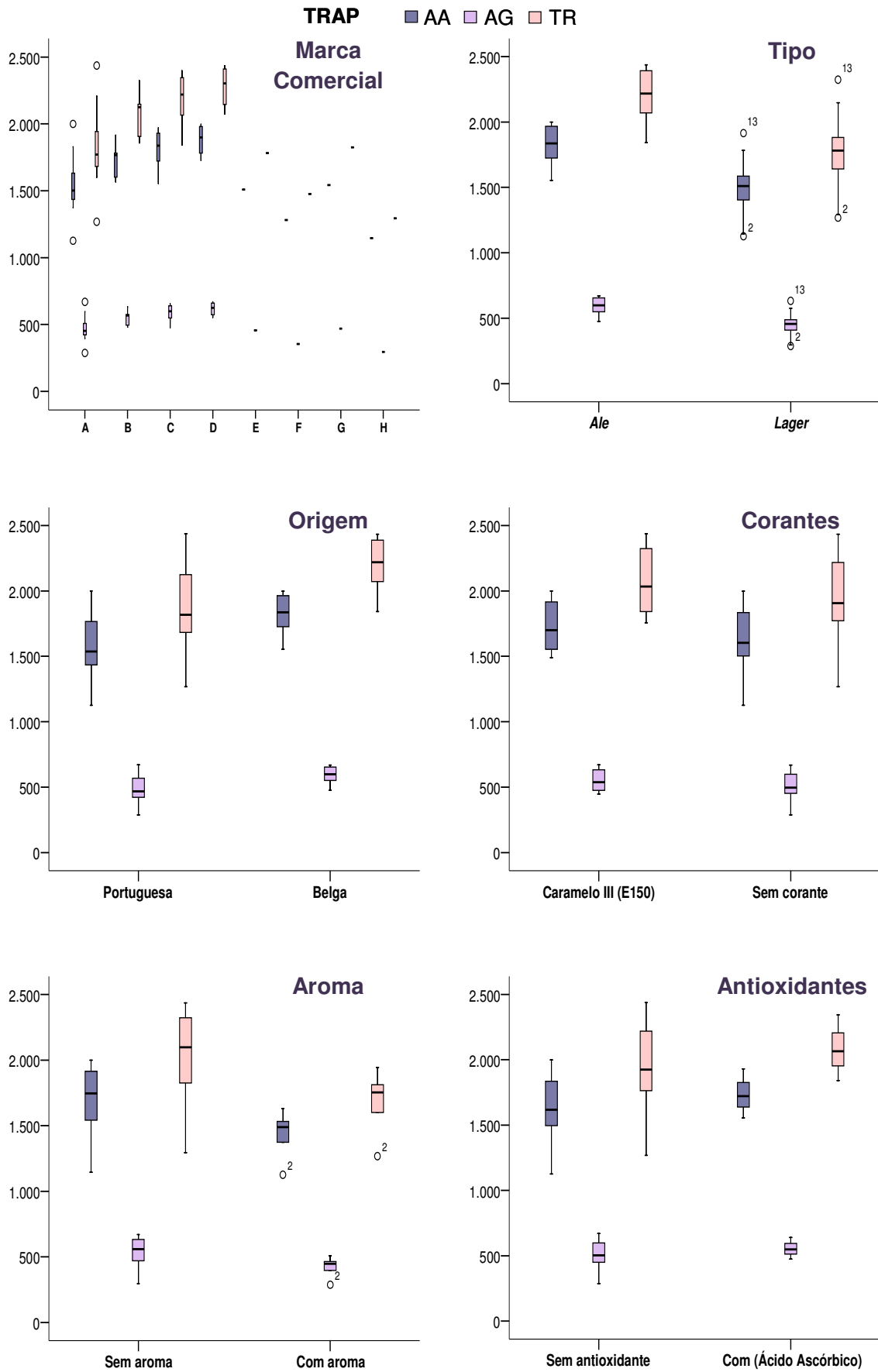


Figura 24 - Valores de CA obtidos pelo método TRAP e agrupados de acordo com vários factores.

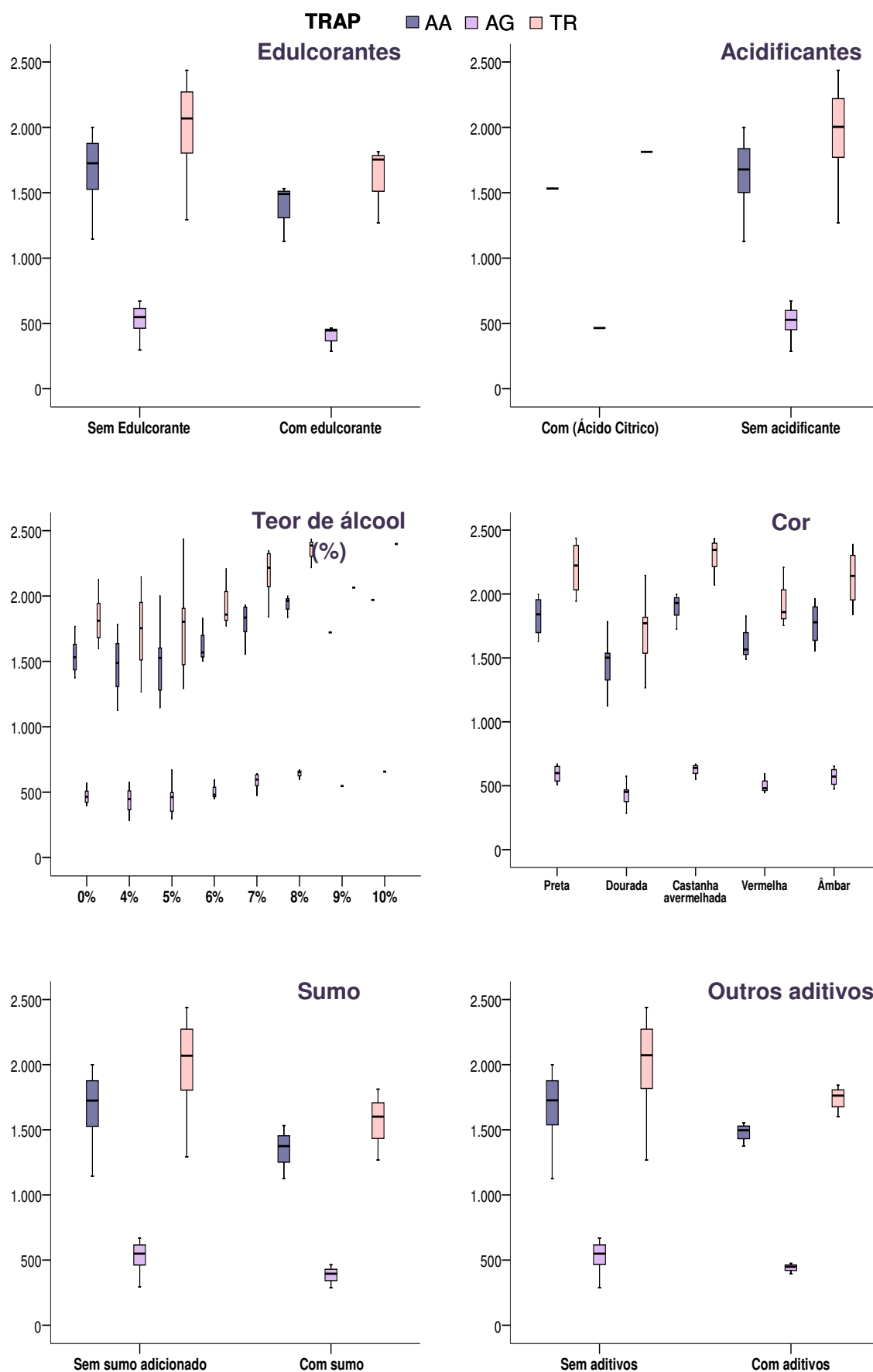


Figura 25 - Valores de CA obtidos pelo método TRAP e agrupados de acordo com vários factores.

3.2.2 TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity

A CA determinada segundo o método TEAC para as 27 amostras e diferentes padrões foi indicada na Tabela 17. Neste método os valores de CA obtidos para o padrão AG foram bastante inferiores aos valores obtidos com os restantes padrões, contudo já não há grande diferença entre os valores obtidos com o AA e o TR. Os valores obtidos variaram entre 156 e 1190 μM , sendo os valores mais baixos de cada padrão relativos à amostra 2 e os valores mais altos à amostra 8. Este registo foi concordante com o obtido no TRAP.

Quando estes valores foram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras, obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figuras 25 e 26. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que a marca D possuía valores de CA superiores aos restantes, seguindo-se as marcas C, B e A. As amplitudes de variação de CA foram muito elevadas para todas as marcas estudadas, sendo especialmente elevadas para a marca C. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores mais elevados para as cervejas com 8% de álcool. As amostras de origem belga apresentam CA ligeiramente às amostras de origem nacional.

Genericamente, os factores corante, antioxidante, acidificante e cor parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos. A presença de edulcorante, aroma, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” contribuiu para valores de CA ligeiramente inferiores e de amplitudes de variação menores (ver Figuras 26 e 27).

Tabela 17 – CA das amostras pelo método TEAC para os padrões AA, AG e TR.

Amostra nº	Concentração (µM)					
	AA		AG		TR	
1	734,3	± 45,8	196,4	± 14,7	736,2	± 57,0
2	606,4	± 0,0	155,5	± 0,0	577,1	± 0,0
3	812,2	± 3,2	221,3	± 1,0	833,1	± 4,0
4	714,4	± 80,4	190,1	± 25,7	711,4	± 100,0
5	649,1	± 5,6	169,2	± 1,8	630,1	± 7,0
6	712,1	± 82,0	189,3	± 26,2	708,6	± 102,0
7	906,5	± 14,5	251,5	± 4,6	950,5	± 18,0
8	1098,6	± 30,5	313,0	± 9,8	1189,5	± 38,0
9	726,9	± 1,6	194,1	± 0,5	727,0	± 2,0
10	629,7	± 111,7	163,0	± 35,7	606,1	± 139,0
11	840,0	± 57,1	230,2	± 18,3	867,7	± 71,0
12	736,0	± 11,3	197,0	± 3,6	738,3	± 14,0
13	963,3	± 12,9	269,7	± 4,1	1021,2	± 16,0
14	799,1	± 15,3	217,2	± 4,9	816,8	± 19,0
15	813,3	± 46,6	221,7	± 14,9	834,5	± 58,0
16	883,2	± 37,8	244,1	± 12,1	921,5	± 47,0
17	827,5	± 36,2	226,2	± 11,6	852,2	± 45,0
18	936,1	± 40,2	261,0	± 12,9	987,3	± 50,0
19	659,3	± 13,7	172,4	± 4,4	642,8	± 17,0
20	894,0	± 17,7	247,5	± 5,7	934,9	± 22,0
21	1009,4	± 39,4	284,4	± 12,6	1078,5	± 49,0
22	982,1	± 47,4	275,7	± 15,2	1044,6	± 59,0
23	1009,9	± 9,6	284,6	± 3,1	1079,2	± 12,0
24	650,8	± 64,3	169,7	± 20,6	632,2	± 80,0
25	709,3	± 52,2	188,4	± 16,7	705,1	± 65,0
26	688,8	± 24,9	181,9	± 8,0	679,6	± 31,0
27	766,1	± 26,5	206,6	± 8,5	775,8	± 33,0

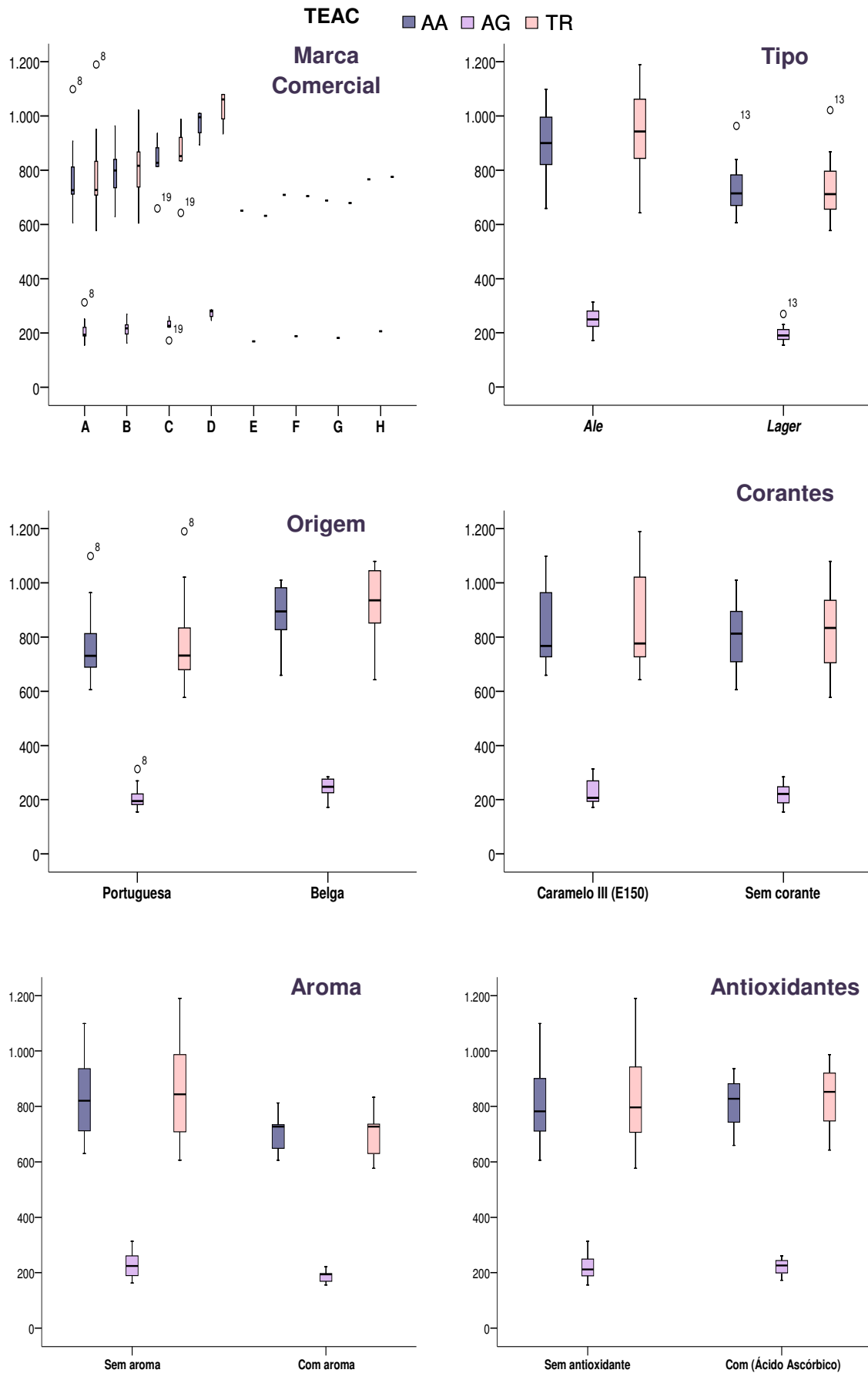


Figura 26 - Valores de CA obtidos pelo método TEAC e agrupados de acordo com vários factores.

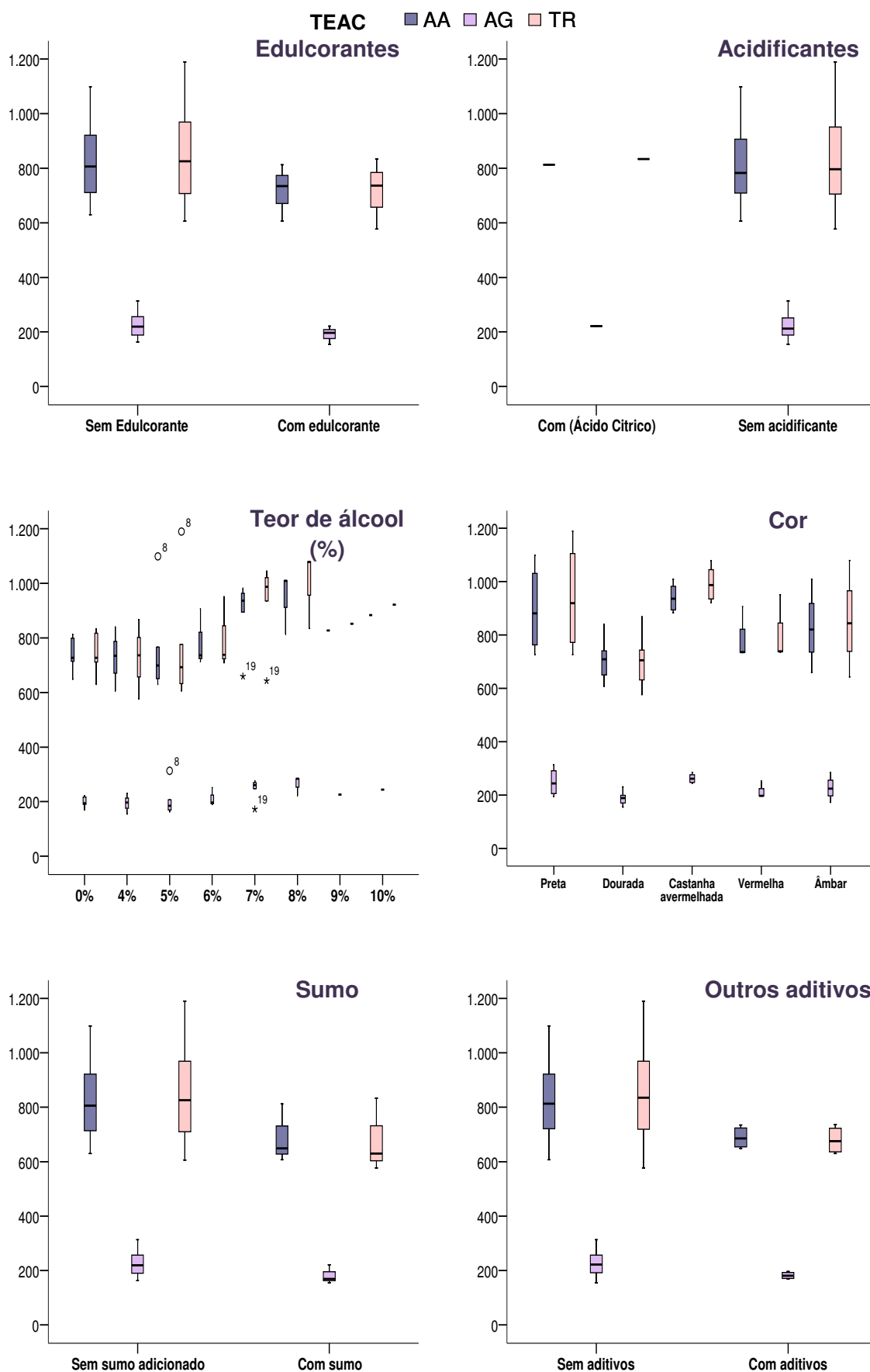


Figura 27 - Valores de CA obtidos pelo método TEAC e agrupados de acordo com vários factores.

3.2.3 DPPH, 2,2-Difenil-1-picahidrazina

Na Tabela 18 foram indicados os valores da CA obtida com o método DPPH para os diferentes padrões. Ao contrário do verificado para os métodos anteriores, o padrão AA forneceu valores mais baixos de CA. Os valores expressos em termos de AG e TR foram os mais elevados e semelhantes entre si.

Neste método, os valores de CA foram consideravelmente inferiores aos obtidos nos métodos anteriormente descritos com a CA a variar entre 0,0 e 666 μ M. A amostra 14 (marca B preta) apresentou os valores mais baixos de CA. Não foi mesmo possível quantificar este parâmetro aquando da sua expressão em AA. Neste caso, mencionou-se apenas ND, querendo com isto indicar que o valor não foi detectado, isto é, estava abaixo do limite de detecção encontrado para o método e o referido padrão. Relativamente aos valores de CA mais elevados, a amostra 8 continuou a ser aquela com maior CA para cada padrão.

Quando estes valores se encontraram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras, obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figuras 28 e 29. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que as marcas B, C e D possuíam valores de CA muito semelhantes entre si, seguindo-se a marca A. Os valores de CA das restantes foram muito inferiores às supracitadas. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores muito dispersos. Esta dispersão foi bem evidente nas cervejas com 5 % de álcool, o grupo de amostras com maior frequência comercial.

Genericamente, os factores origem, corante, antioxidante, acidificante e cor parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos. A presença de edulcorante, aroma, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” contribuiu para valores de CA ligeiramente inferiores e de amplitudes de variação menores.

Tabela 18 – CA das amostras pelo método DPPH para os padrões AA, AG e TR.

Amostra n ^o	Concentração (µM)					
	AA		AG		TR	
1	108,4	± 0,0	272,6	± 0,0	285,1	± 0,0
2	31,9	± 0,0	120,9	± 0,0	181,5	± 0,0
3	121,1	± 0,0	297,8	± 0,0	302,4	± 0,0
4	155,1	± 0,0	365,3	± 0,0	348,4	± 0,0
5	98,6	± 0,6	253,2	± 1,2	271,9	± 0,8
6	101,6	± 0,0	259,1	± 0,0	275,9	± 0,0
7	179,3	± 0,6	413,3	± 1,2	381,3	± 0,8
8	306,3	± 0,0	665,3	± 0,0	553,4	± 0,0
9	152,5	± 0,0	360,2	± 0,0	345,0	± 0,0
10	186,1	± 1,8	426,8	± 3,6	390,5	± 2,4
11	188,2	± 86,5	431,0	± 171,6	393,4	± 117,3
12	172,5	± 49,9	399,8	± 98,9	372,1	± 67,6
13	244,3	± 18,0	542,2	± 35,8	469,4	± 24,4
14	ND		33,2	± 73,9	121,6	± 50,5
15	217,9	± 50,5	490,0	± 100,1	433,7	± 68,4
16	191,6	± 22,8	437,7	± 45,3	398,0	± 30,9
17	254,9	± 11,4	563,3	± 22,6	483,8	± 15,5
18	159,3	± 80,5	373,7	± 159,7	354,2	± 109,1
19	178,4	± 1,8	411,6	± 3,6	380,1	± 2,4
20	162,7	± 13,2	380,4	± 26,2	358,8	± 17,9
21	240,9	± 2,4	535,5	± 4,8	464,8	± 3,3
22	216,2	± 31,2	486,6	± 62,0	431,4	± 42,3
23	198,8	± 17,4	452,1	± 34,6	407,8	± 23,6
24	72,3	± 16,2	200,9	± 32,2	236,2	± 22,0
25	30,2	± 15,6	117,5	± 31,0	179,2	± 21,2
26	78,6	± 94,9	213,6	± 188,3	244,8	± 128,7
27	91,8	± 10,2	239,7	± 20,3	262,7	± 13,8

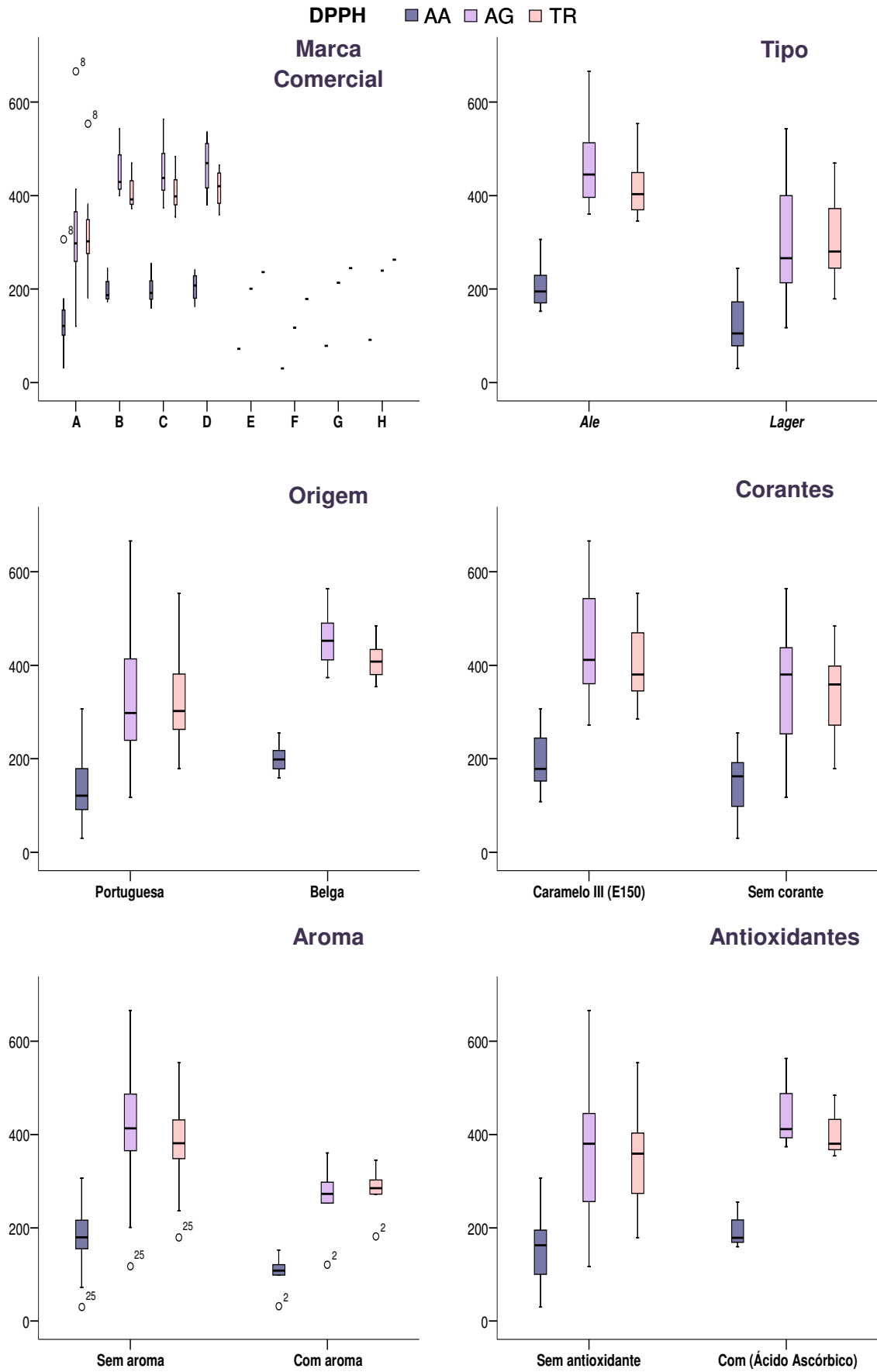


Figura 28 - Valores de CA obtidos pelo método DPPH e agrupados de acordo com vários factores.

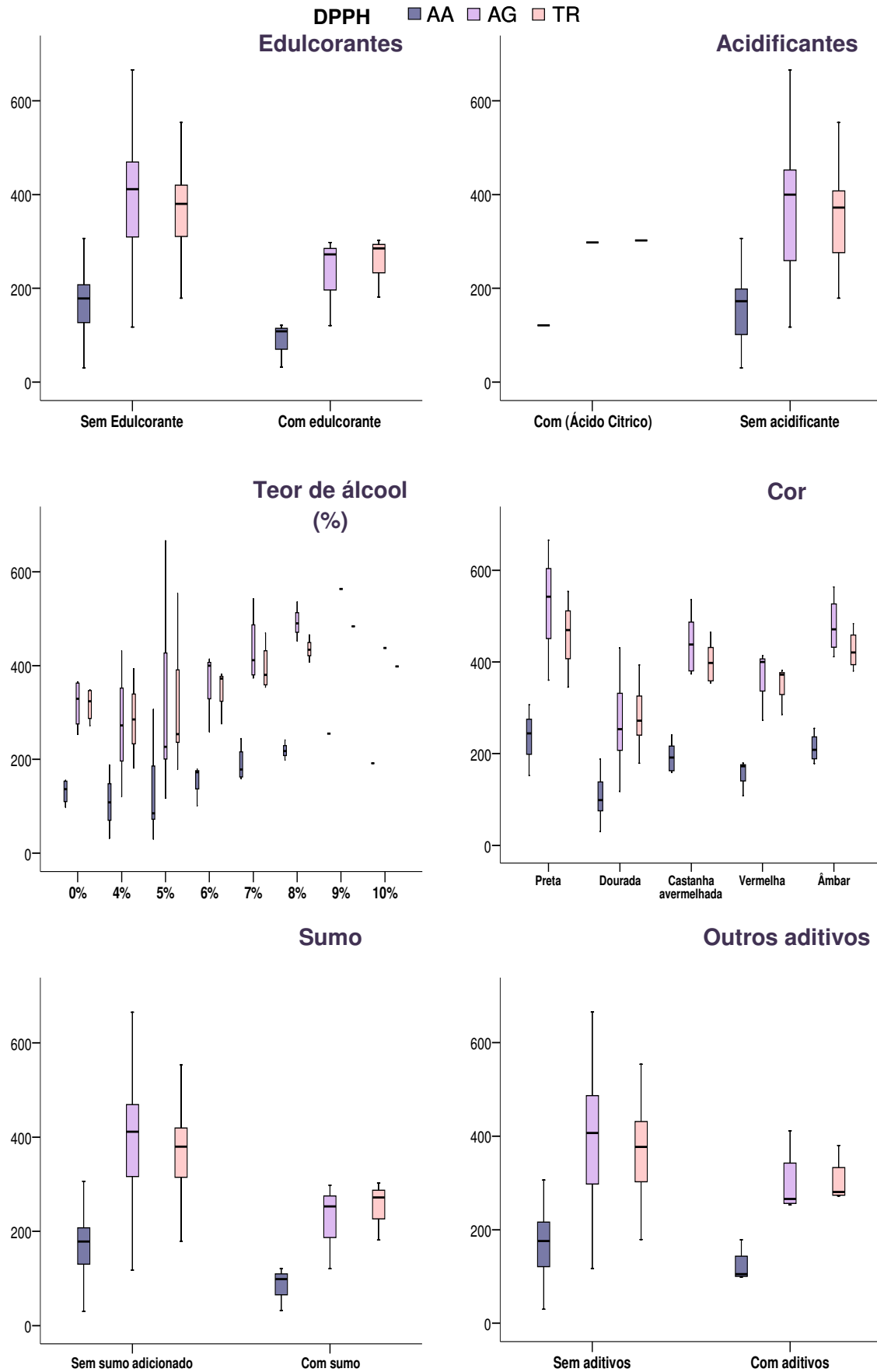


Figura 29 - Valores de CA obtidos pelo método DPPH e agrupados de acordo com vários factores.

3.2.4 FRAP, Ferric ion reducing antioxidant power

A CA determinada segundo o método FRAP foi estudada ao longo de 200 minutos para o padrão AA e 240 minutos para os restantes, obtendo-se deste modo um valor de CA relativo a cada um dos padrões para cada tempo. A variação da CA ao longo do tempo, para os vários padrões, está representada nas Figuras 30, 31 e 32.

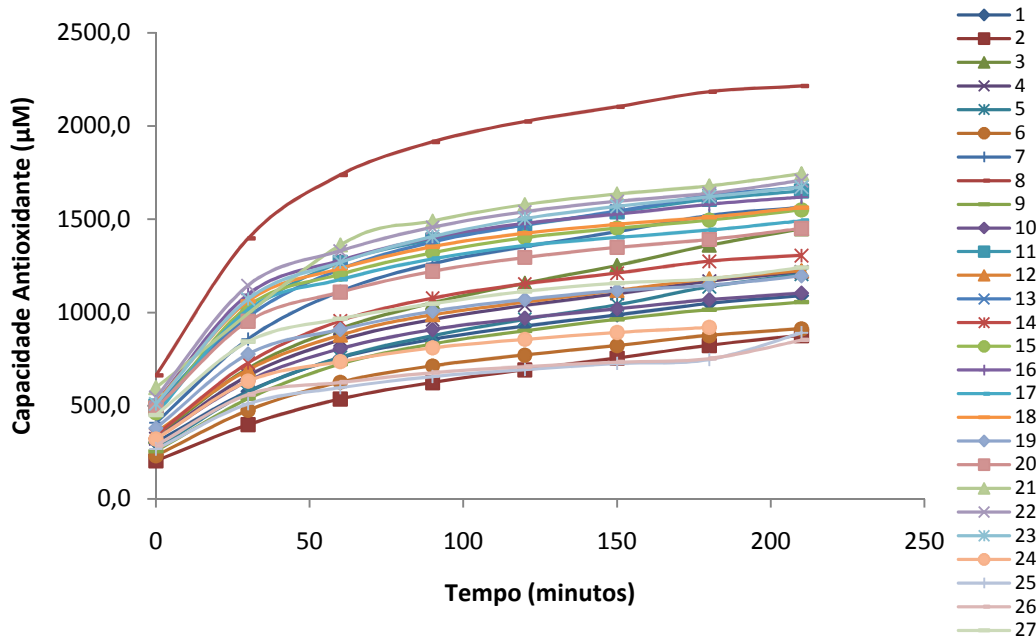


Figura 30 – Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão AA.

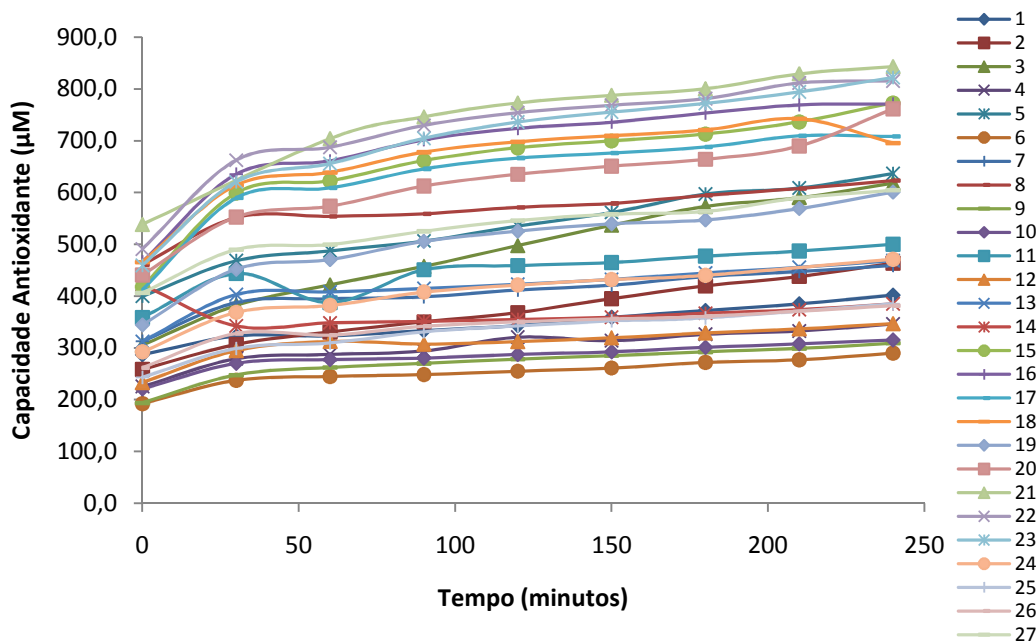


Figura 31 - Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão AG.

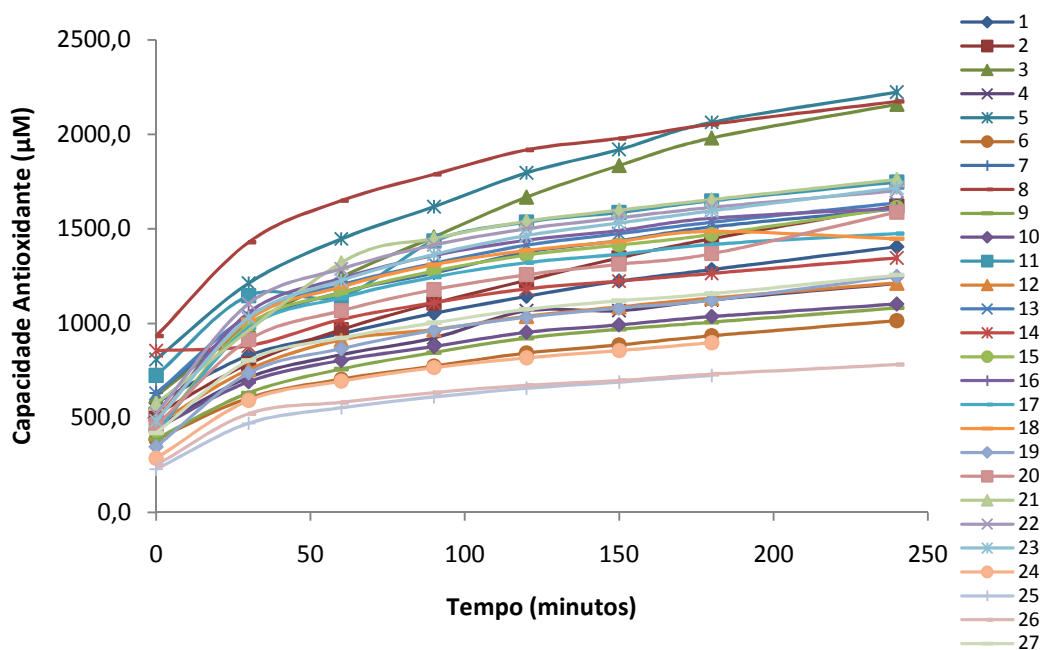


Figura 32 - Evolução da CA ao longo do tempo para o método FRAP, padrão TR.

A CA aumentou gradualmente ao longo do tempo até começar a estabilizar aproximadamente aos 150 minutos para quase todas as amostras. Neste sentido, os resultados utilizados para considerações analíticas deste método reportam os valores de CA correspondentes a 180 minutos (Tabela 19). Os restantes valores encontram-se indicados no Anexo A (Tabelas A1 a A6).

Neste método, os valores mais baixos de CA foram obtidos para o padrão AG e os mais elevados para o padrão TR. A CA para o método FRAP (180 minutos) variou entre 272 μM , para a amostra 6 com o padrão AG, e 2054 μM , obtido para o padrão TR e amostra 8, ambas as amostras da marca A.

Quando estes valores se encontram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figuras 33 e 34. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que as várias marcas comerciais possuíam valores muito próximos entre si, havendo uma amplitude de variação de CA mais elevada para a marca A. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores muito dispersos. Esta dispersão foi bem evidente nas cervejas com 0 % de álcool. As amostras de cor preta apresentaram valores de CA mais elevados e as amostras douradas uma maior dispersão de valores.

Genericamente, os factores corante, aroma, antioxidante, edulcorante, acidificante, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos. As cervejas de origem belga forneceram valores tendencialmente superiores às portuguesas.

Tabela 19 – CA das amostras pelo método FRAP para os padrões AA, AG e TR para o tempo 180 minutos.

Amostra nº	Concentração (µM)					
	AA		AG		TR	
1	1048,9	± 28,9	372,5	± 38,3	1283,8	± 133,1
2	823,8	± 36,8	419,7	± 62,5	1447,8	± 217,1
3	1360,6	± 182,9	573,0	± 48,4	1980,1	± 168,0
4	1168,0	± 0,0	326,2	± 0,6	1123,0	± 2,0
5	1138,2	± 121,0	597,1	± 373,4	608,1	± 1296,6
6	876,8	± 9,2	271,7	± 40,7	934,0	± 141,3
7	1520,6	± 90,8	437,5	± 60,8	1509,7	± 211,0
8	2184,0	± 15,8	594,2	± 9,4	2053,9	± 32,8
9	1015,4	± 73,7	292,4	± 50,1	1005,7	± 174,1
10	1068,5	± 82,9	301,1	± 30,1	1036,1	± 104,5
11	1607,1	± 97,4	477,2	± 8,3	1647,7	± 28,7
12	1181,0	± 57,9	329,0	± 83,8	1132,8	± 290,9
13	1627,6	± 100,0	444,7	± 49,5	1534,7	± 172,1
14	1274,1	± 13,2	366,8	± 7,7	1264,2	± 26,6
15	1494,9	± 23,3	712,6	± 11,1	1470,5	± 23,2
16	1580,4	± 6,7	753,2	± 3,2	1555,7	± 6,6
17	1442,3	± 95,4	687,7	± 45,3	1418,1	± 95,1
18	1511,3	± 86,6	720,4	± 41,0	1486,9	± 86,3
19	1145,7	± 71,0	547,0	± 33,7	1122,4	± 70,8
20	1392,1	± 182,0	663,9	± 86,3	1368,0	± 181,4
21	1679,3	± 13,3	800,1	± 6,3	1654,3	± 13,3
22	1638,5	± 24,4	780,7	± 11,6	1613,6	± 24,3
23	1619,6	± 84,3	771,8	± 40,0	1594,8	± 84,1
24	920,5	± 76,6	440,2	± 36,3	898,0	± 76,3
25	747,1	± 37,7	358,0	± 17,9	725,1	± 37,6
26	753,3	± 139,8	361,0	± 66,3	731,4	± 139,4
27	1180,2	± 11,1	563,4	± 5,3	1156,8	± 11,1

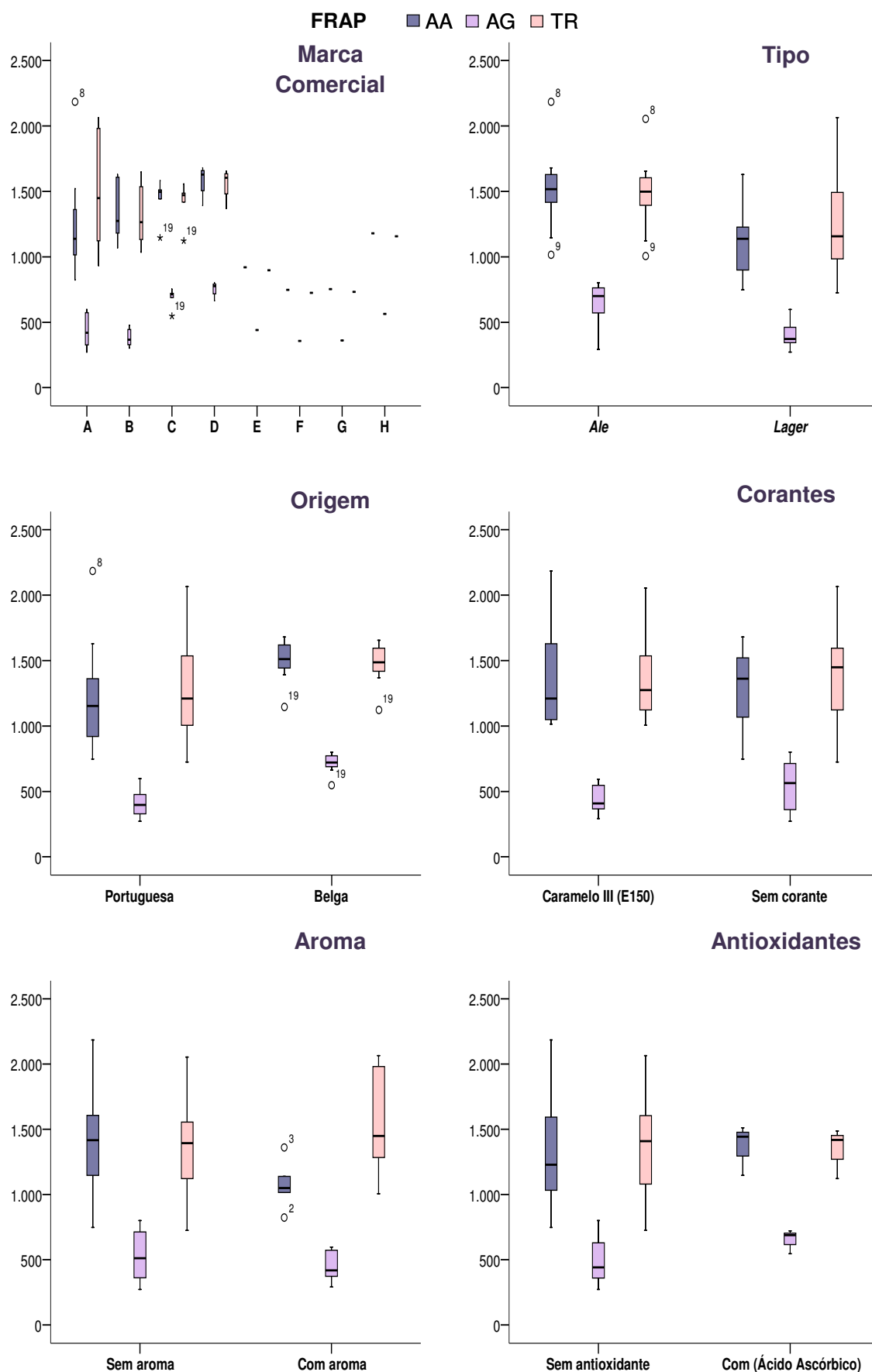


Figura 33 - Valores de CA obtidos pelo método FRAP e agrupados de acordo com vários factores.

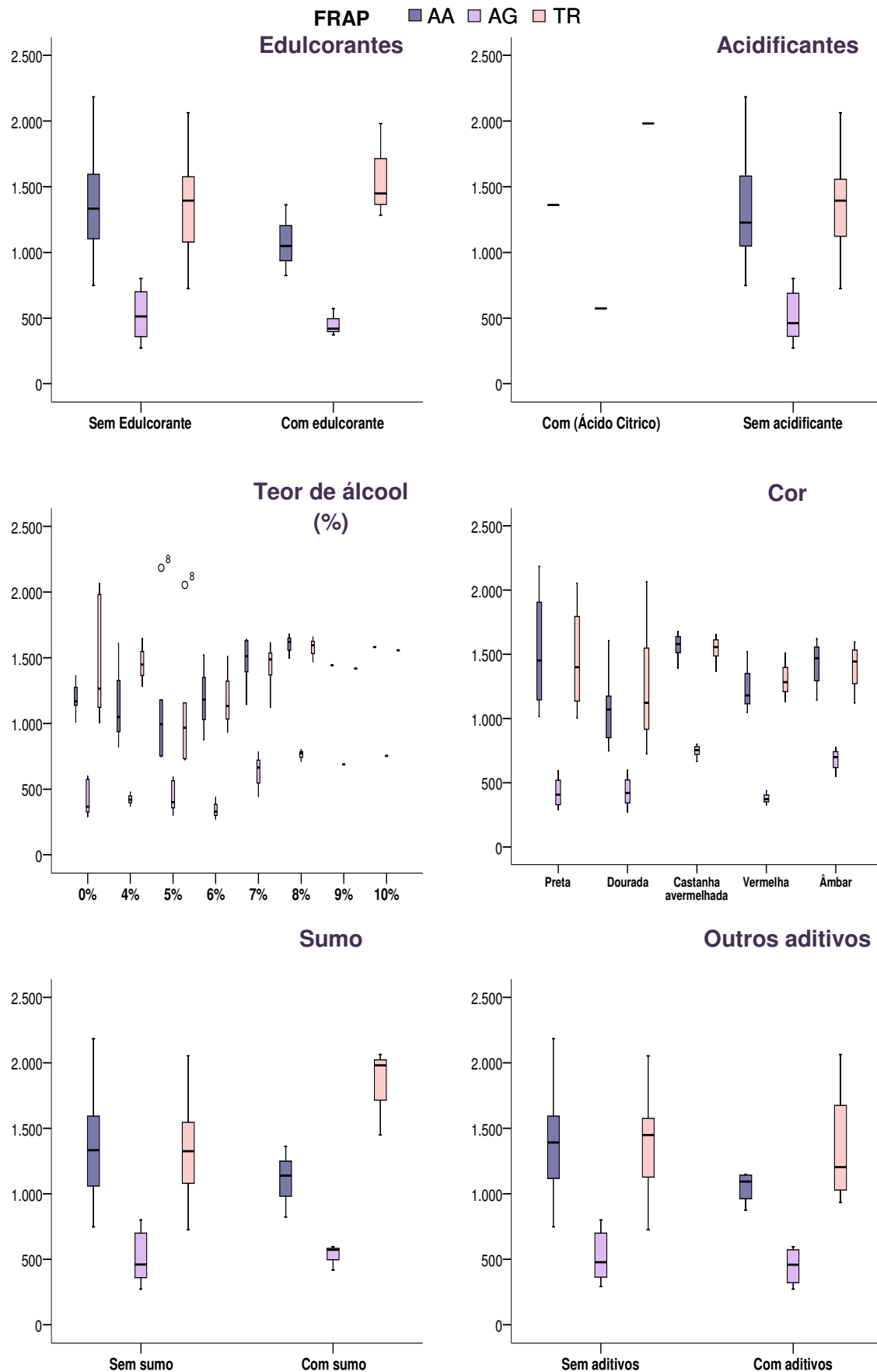


Figura 34 - Valores de CA obtidos pelo método FRAP e agrupados de acordo com vários factores.

3.2.5 CUPRAC, *Reducing antioxidant capacity*

Neste método os valores de CA obtidos foram mais elevados do que os obtidos nos métodos TRAP, TEAC, DPPH e FRAP, tendo variado entre 187 e 3423 μM , para a amostra 2 (cerveja da marca A) com o padrão AG, resultado comum aos métodos TRAP, e TEAC, e para amostra 8 (cerveja da marca A) com padrão TR, respectivamente. A amostra 2 originou, para todos os padrões, o valor de CA mais baixo e a amostra 8 o valor mais elevado (resultado comum a todos os métodos).

Quando estes valores se encontram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figuras 35 e 36. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que a marca D possuía valores de CA superiores aos restantes, seguindo-se as marcas C, B e A. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores muito dispersos para os vários teores de álcool. As amostras de origem portuguesa apresentaram valores inferiores de CA relativamente às amostras de origem belga.

Genericamente, os factores corante, antioxidante, acidificante e cor parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos. A presença de edulcorante, aroma, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” contribuiu para valores de CA ligeiramente inferiores e de amplitudes de variação menores.

Tabela 20 – CA das amostras pelo método CUPRAC para os padrões AA, AG e TR.

Amostra nº	Concentração (µM)					
	AA		AG		TR	
1	1131,4	± 17,1	278,0	± 4,7	1387,5	± 21,3
2	800,8	± 48,9	186,8	± 13,5	977,5	± 60,7
3	1200,6	± 2,4	297,1	± 0,7	1473,4	± 3,0
4	1005,0	± 39,2	243,2	± 10,8	1230,8	± 48,6
5	1107,1	± 17,1	271,4	± 4,7	1357,5	± 21,3
6	1053,5	± 4,9	256,6	± 1,4	1290,9	± 6,1
7	1666,1	± 19,6	425,6	± 5,4	2051,0	± 24,3
8	2771,9	± 7,3	730,7	± 2,0	3423,0	± 9,1
9	1214,4	± 7,3	301,0	± 2,0	1490,6	± 9,1
10	918,5	± 9,8	219,3	± 2,7	1123,5	± 12,1
11	1489,6	± 48,9	376,9	± 13,5	1832,0	± 60,7
12	1005,0	± 34,3	243,2	± 9,5	1230,8	± 42,5
13	1564,0	± 56,3	397,4	± 15,5	1924,3	± 69,8
14	1340,8	± 166,4	335,8	± 45,9	1647,3	± 206,5
15	1741,8	± 17,6	439,7	± 4,9	2141,7	± 21,9
16	1800,0	± 111,6	455,7	± 30,8	2213,8	± 138,5
17	1480,1	± 29,4	367,5	± 8,1	1817,1	± 36,4
18	1984,8	± 55,8	506,7	± 15,4	2443,1	± 69,2
19	1314,0	± 35,2	321,6	± 9,7	1611,0	± 43,7
20	1446,9	± 182,1	358,3	± 50,2	1775,8	± 225,9
21	2157,1	± 129,2	554,3	± 35,7	2657,0	± 160,3
22	2057,5	± 76,4	526,8	± 21,1	2533,3	± 94,7
23	2416,7	± 32,3	625,9	± 8,9	2979,1	± 40,1
24	922,5	± 36,7	228,9	± 10,1	1132,4	± 45,5
25	845,9	± 89,9	207,8	± 24,8	1037,4	± 111,6
26	857,6	± 47,7	211,0	± 13,2	1051,9	± 59,2
27	1183,4	± 9,2	300,9	± 2,5	1456,1	± 11,4

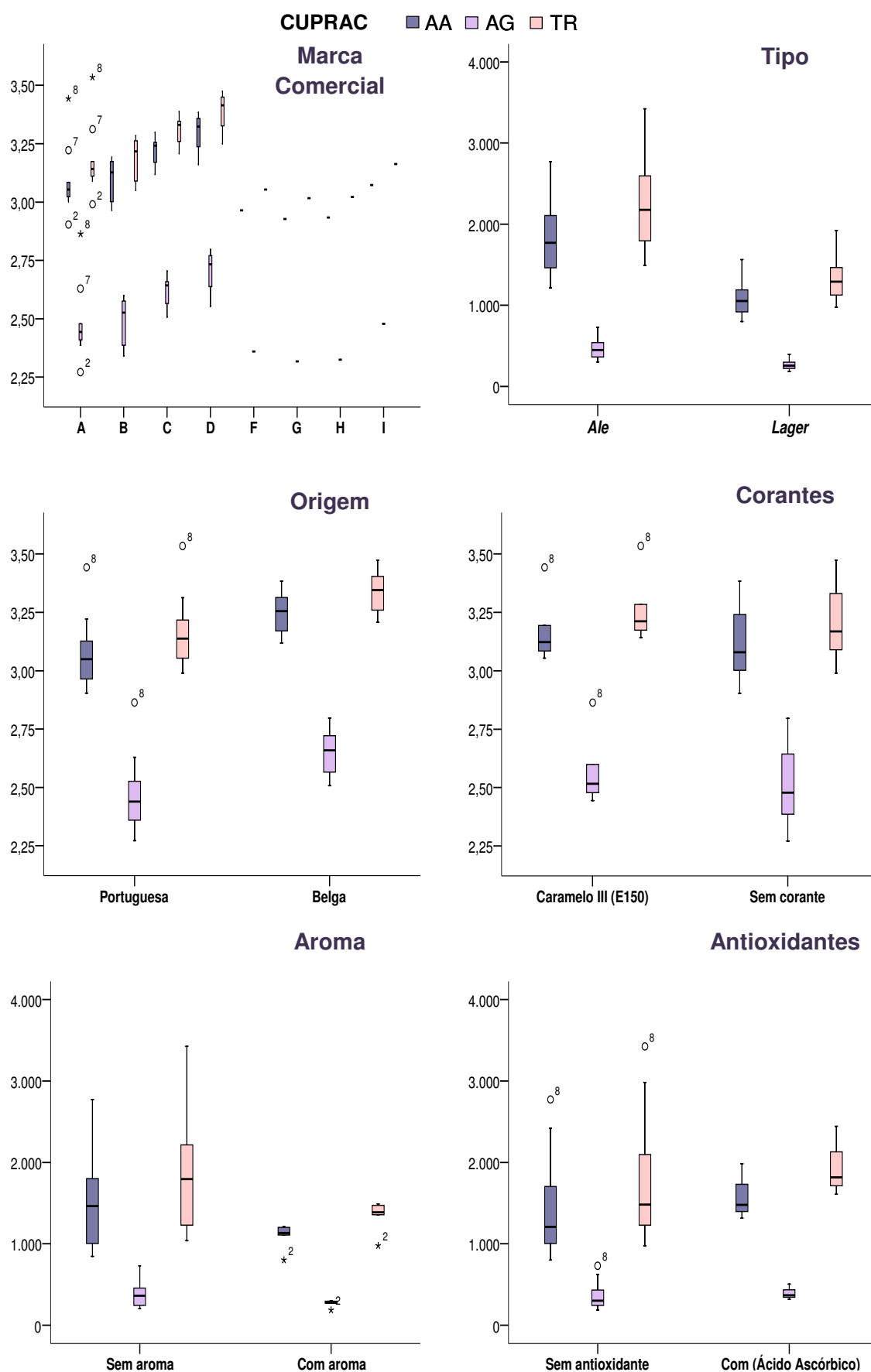


Figura 35 - Valores de CA obtidos pelo método CUPRAC e agrupados de acordo com vários factores.

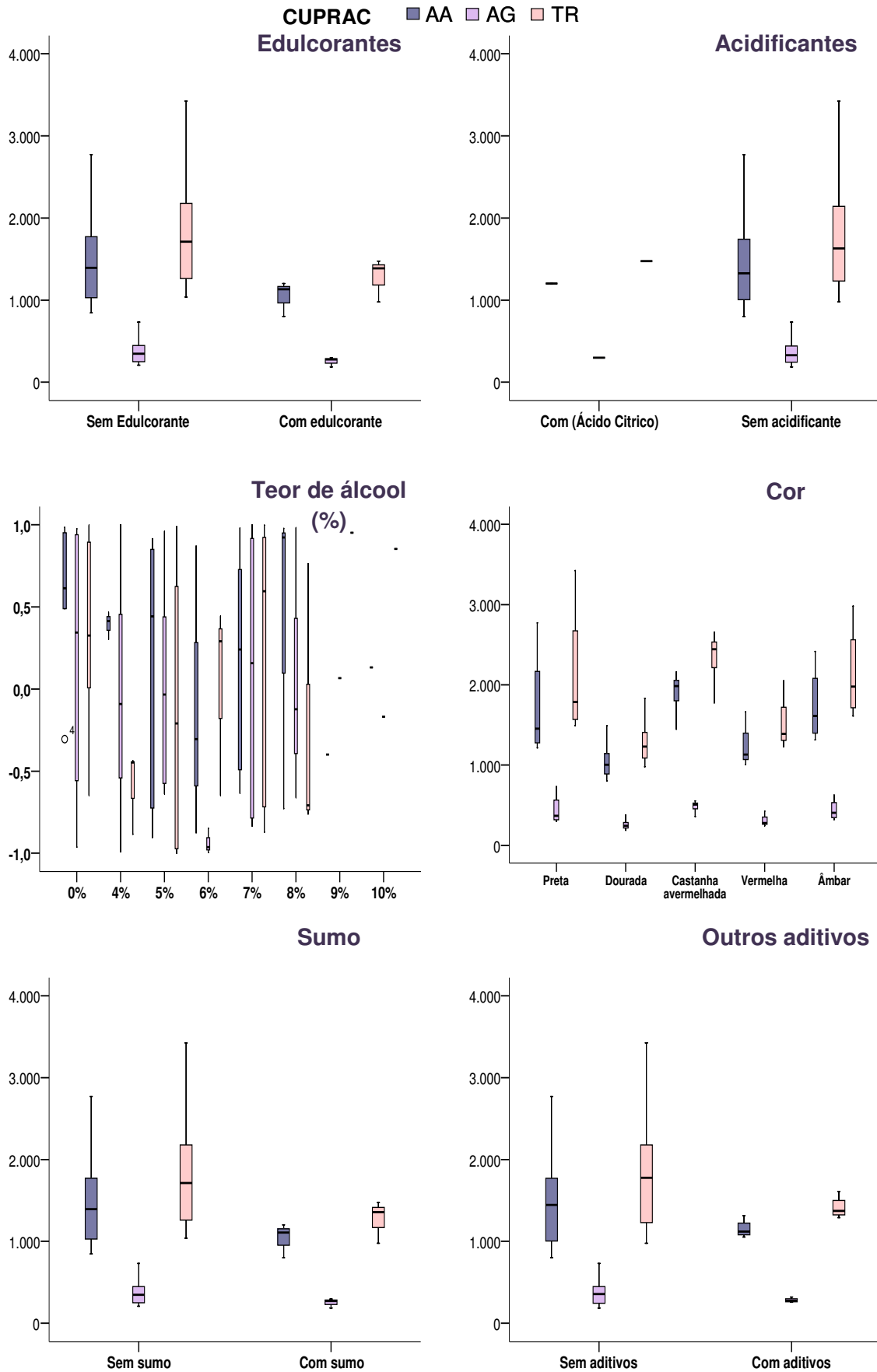


Figura 36 - Valores de CA obtidos pelo método CUPRAC e agrupados de acordo com vários factores.

3.2.6 ORAC – Oxigen radical absorbance capacity

A CA obtida para este método está indicada na Tabela 21 e variou entre valores não detectados, para a amostra 2 com o padrão AA, e 29106 μM , para a amostra 8 com o padrão TR. De um modo geral, obteve-se uma menor CA para o padrão AG e uma CA superior para o padrão TR. A amostra 8 apresentou uma CA superior à das restantes amostras para todos os padrões (resultado comum a todos os métodos) e a amostra 2 apresentou uma CA inferior para todos os padrões, registo concordante com os métodos TRAP, TEAC e CUPRAC.

Quando estes valores se foram agrupados segundo factores referenciados na caracterização das amostras obtêm-se as caixas de bigodes representadas nas Figuras 37 e 38. Relativamente às marcas comerciais estudadas verificou-se que a marca D possuía valores de CA superiores às restantes, seguindo-se as marcas C, A e B. As cervejas de tipo *Ale* apresentaram valores de CA superiores às de tipo *Lager*. Os resultados agrupados segundo o teor de álcool apresentaram valores mais elevados para as amostras com 8% de álcool. As amostras de origem belga forneceram valores de CA superiores às amostras de origem portuguesa. As amostras de cor preta apresentaram valores de dispersão muito elevados, as amostras douradas forneceram os valores de CA mais baixos e as amostras castanhas avermelhadas os valores mais elevados.

Genericamente, os factores corante, antioxidante e acidificante parecem ter fornecido, para cada padrão, valores semelhantes entre os vários grupos constituídos. A presença de edulcorante, aroma, sumo adicionado ou do factor “outros aditivos” contribuiu para valores de CA ligeiramente inferiores e de amplitudes de variação menores.

Tabela 21 – CA das amostras pelo método ORAC para os padrões AA, AG e TR.

Amostra	AUC Relativa	Concentração (μM)					
		AA		AG		TR	
1	1,8	2985,3	\pm 225,7	3131,5	\pm 136,3	7585,5	\pm 254,1
2	1,6	ND		1046,4	\pm 764,1	3697,3	\pm 1424,9
3	1,8	2477,2	\pm 821,3	2824,7	\pm 495,9	7013,3	\pm 924,8
4	1,8	2643,7	\pm 1566,4	2925,2	\pm 945,9	7200,9	\pm 1763,8
5	2,0	5753,1	\pm 1977,1	4802,9	\pm 1193,9	10702,2	\pm 2226,2
6	2,0	5408,2	\pm 672,7	4594,6	\pm 406,2	10313,8	\pm 757,4
7	2,5	13220,2	\pm 172,4	9312,0	\pm 104,1	19110,3	\pm 194,2
8	3,1	22096,7	\pm 3436,6	14672,2	\pm 2075,2	29105,6	\pm 3869,7
9	2,0	5705,4	\pm 2207,9	4774,0	\pm 1333,2	10648,4	\pm 2486,1
10	1,8	2441,1	\pm 2609,4	2802,9	\pm 1575,7	6972,7	\pm 2938,2
11	2,0	5342,1	\pm 12,4	4554,7	\pm 7,5	10239,3	\pm 14,0
12	1,8	2995,6	\pm 2808,1	3137,7	\pm 1695,7	7597,1	\pm 3162,1
13	2,2	9384,7	\pm 410,5	6995,8	\pm 247,9	14791,4	\pm 462,2
14	1,9	4175,6	\pm 265,9	3850,3	\pm 160,6	8925,8	\pm 299,5
15	3,0	20773,8	\pm 1635,7	13873,3	\pm 987,7	27615,8	\pm 1841,8
16	2,7	16433,3	\pm 238,4	11252,2	\pm 143,9	22728,4	\pm 268,4
17	2,6	14249,8	\pm 894,7	9933,7	\pm 540,2	20269,6	\pm 1007,4
18	2,5	13620,3	\pm 5784,2	9553,6	\pm 3492,8	19560,9	\pm 6513,2
19	2,2	8839,9	\pm 706,6	6666,8	\pm 426,7	14177,9	\pm 795,7
20	2,7	15901,4	\pm 2501,3	10931,0	\pm 1510,4	22129,4	\pm 2816,6
21	2,8	18312,8	\pm 1595,2	12387,2	\pm 963,3	24844,8	\pm 1796,3
22	2,9	19056,3	\pm 2084,1	12836,2	\pm 1258,5	25681,9	\pm 2346,8
23	2,5	13961,7	\pm 1663,4	9759,7	\pm 1004,5	19945,3	\pm 1873,0
24	1,7	209,9	\pm 1299,8	1455,6	\pm 784,9	4460,3	\pm 1463,7
25	1,8	2052,2	\pm 3205,9	2568,0	\pm 1935,9	6534,8	\pm 3609,9
26	1,7	1343,6	\pm 169,9	2140,1	\pm 102,6	5736,9	\pm 191,3
27	1,9	3690,5	\pm 1859,9	3557,4	\pm 1123,1	8379,6	\pm 2094,3

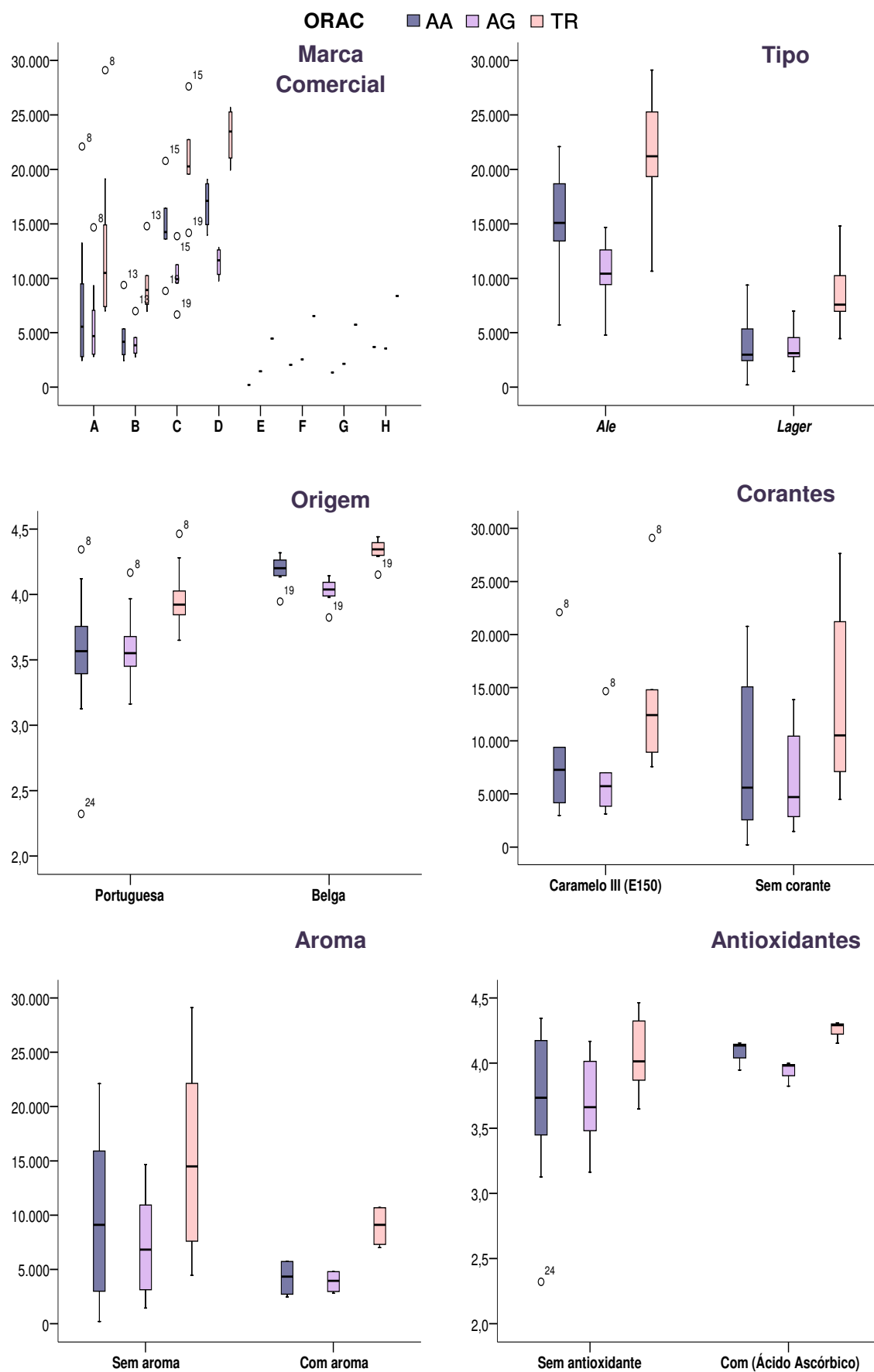


Figura 37 - Valores de CA obtidos pelo método ORAC e agrupados de acordo com vários factores.

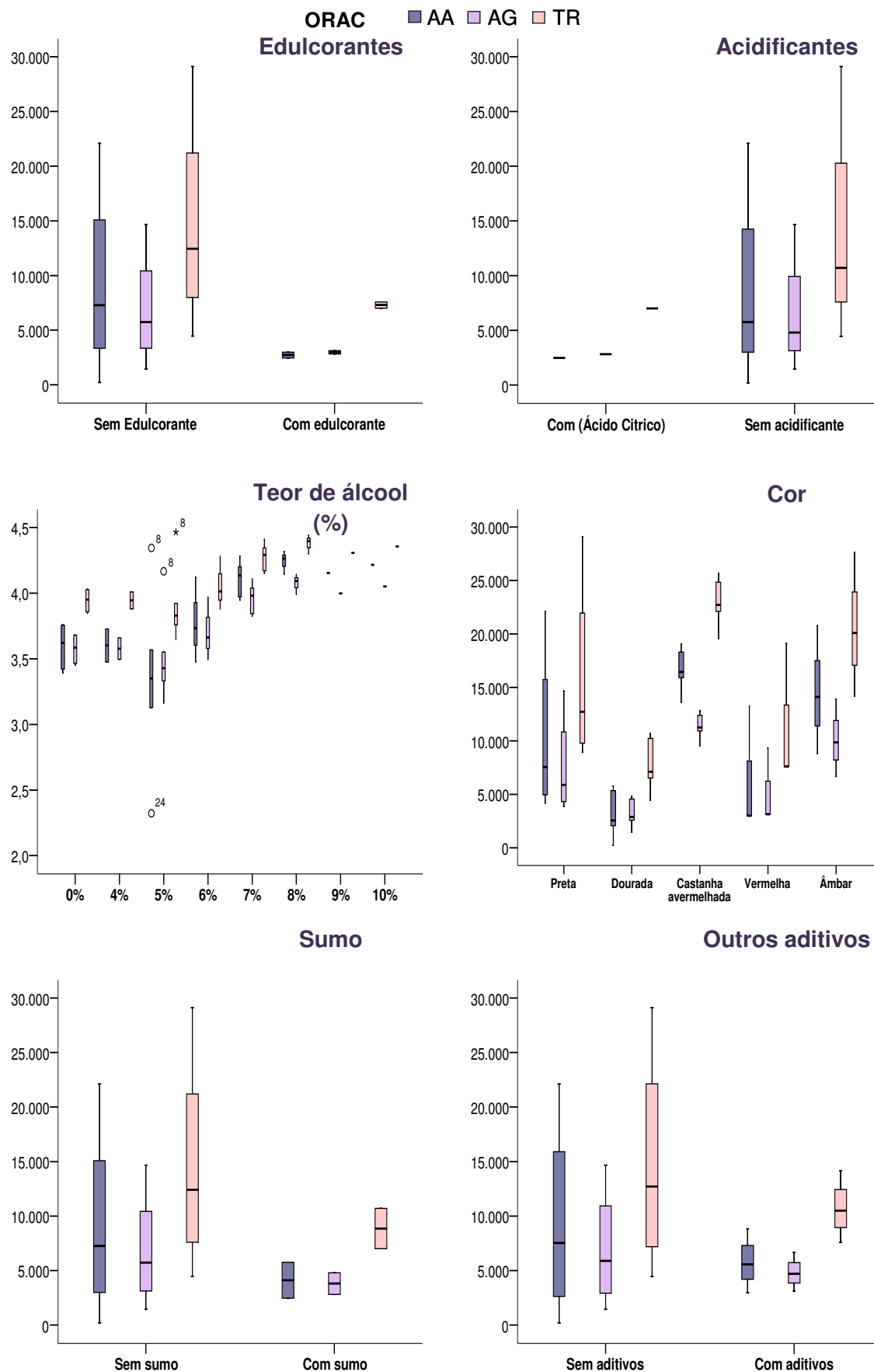


Figura 38 - Valores de CA obtidos pelo método ORAC e agrupados de acordo com vários factores.

3.3 Efeito da amostra

As amostras analisadas apresentaram vários factores que as constituíam de forma diferenciada. Esses factores já indicados aquando da caracterização das amostras (secção 3.1) podem, por isso, ter contribuído para algumas das diferenças observadas entre os valores de CA.

Para avaliar o efeito de cada um destes factores, optou-se pelo teste ANOVA univariada. Este teste analisa o efeito de um factor na variável endógena, testando se as médias da variável endógena em cada categoria do factor são ou não iguais entre si. É uma extensão do teste *t* de *student* usado na comparação de duas ou mais médias, pois o ANOVA univariada permite comparar duas ou mais médias. Uma vez que as observações são independentes entre si, a aplicação deste teste é possível quando os valores da CA obtidos se encontram segundo uma distribuição normal e com variâncias entre cada grupo iguais entre si [17].

Em todos os casos de aplicação deste teste foi garantida a normalidade e homocedasticidade das observações, relativamente ao valor de CA experimental ou a uma sua transformada. Este estudo foi realizado separadamente para cada factor e agrupando os valores segundo o método utilizado. Os valores de significância destes testes foram sempre superiores a 0,01. Os resultados e tabelas detalhadas podem ser consultados nas Tabelas B1 e B282 no Anexo B.

3.3.1 Marca Comercial

Relativamente ao efeito da Marca, o estudo ANOVA pretende determinar se o valor de CA foi igual para os grupos das várias marcas, utilizando-se para esse efeito o teste F. As hipóteses formuladas foram (i) a hipótese nula, H_0 , em que $\mu_{\text{Super Bock}} = \mu_{\text{Sagres}} = \mu_{\text{Grimbergen}} = \mu_{\text{Lefte}} = \mu_{\text{Imperial}} = \mu_{\text{Auchan}} = \mu_{\text{Jumbo}} = \mu_{\text{Tagus}}$ e (ii) a hipótese alternativa, H_1 em que $\mu_{\text{Super Bock}} \neq \mu_{\text{Sagres}} \neq \mu_{\text{Grimbergen}} \neq \mu_{\text{Lefte}} \neq \mu_{\text{Imperial}} \neq \mu_{\text{Auchan}} \neq \mu_{\text{Jumbo}} \neq \mu_{\text{Tagus}}$. Os dados estatísticos relativos a este estudo podem ser encontrados no anexo B, Tabelas B1 a B30.

Para os métodos TRAP, TEAC, DPPH e CUPRAC o teste F forneceu um valor de *p* superior a 0,01 o que levou à aceitação da hipótese H_0 . O teste ANOVA sugeriu, por isso, a existência de apenas um subconjunto homogéneo de médias para as várias marcas.

Para o método FRAP o teste F forneceu um valor de *p* superior a 0,01 para os padrões AA e TR e inferior para o padrão AG, sendo que para este existem dois

subconjuntos homogêneos, em que as marcas A e B pertencem a um grupo e as marcas C e D a outro, este último grupo com CA maior que o anterior.

O método ORAC forneceu um valor de p para o teste F, inferior a 0,01 o que leva à rejeição da hipótese H_0 . O teste ANOVA sugeriu a existência de dois subconjuntos homogêneos em que as marcas A e D pertencem a subgrupos diferentes, fornecendo a marca D os valores de CA superiores.

3.3.2 Tipo

O teste F aplicado aos dois tipos de cerveja (*Ale* ou *lager*) foi efectuado considerando as hipóteses nula ($H_0: \mu_{ale} = \mu_{lager}$) e alternativa ($H_1: \mu_{ale} \neq \mu_{lager}$). Os resultados decorrentes deste estudo podem ser consultados no Anexo B desta dissertação, tabelas B30 e B54.

Para os métodos TRAP, TEAC, DPPH, CUPRAC e ORAC o teste F forneceu um valor de $p < 0,01$ o que levou à rejeição da hipótese H_0 . Neste sentido, os resultados dos dois grupos parecem ser estatisticamente diferentes entre si, para um intervalo de confiança de 99 %.

O método FRAP forneceu um valor de $p < 0,01$ para os padrões AA e AG, mas um valor superior para o padrão TR, sugerindo que para este padrão as amostras *ale* e *lager* são estatisticamente diferentes.

3.3.3 Origem

As hipóteses formuladas para o teste F consideram para hipótese nula a igualdade entre as médias de CA de cervejas portuguesas e belgas ($H_0: \mu_{Portuguesa} = \mu_{Belga}$) e para hipótese alternativa a possível existência de diferenças entre essas médias ($H_1: \mu_{Portuguesa} \neq \mu_{Belga}$). Todos os dados estatísticos decorrentes deste estudo podem ser consultados no Anexo B, Tabelas B55 a B78.

Para os métodos TRAP, CUPRAC e ORAC o teste F forneceu um valor de $p < 0,01$, o que conduziu à rejeição da hipótese H_0 . Este registo sugere a existência de diferenças significativas entre os grupos indicados.

Para o método TEAC e DPPH o comportamento observado foi diferente, com valores superiores a 0,01. Neste sentido, os resultados deste método sugerem a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as cervejas de origem portuguesa e belga.

Para o método FRAP com os padrões AA e TR o teste F originou um valor de $p > 0,01$, não havendo para estes padrões diferenças estatisticamente significativas entre os

grupos constituídos. Com o padrão AG o teste F forneceu um valor de $p < 0,01$, o que sugeriu a existência de diferenças estatisticamente significativa entre os dois grupos.

3.3.4 Corantes

As amostras de cerveja apresentavam, ou não, a adição de corante. Para avaliar o efeito exercido por este factor nos valores de CA obtidos, optou-se por considerar as hipóteses seguintes para o teste F: (i) $H_0: \mu_{\text{Sem}} = \mu_{\text{Com}}$; ou (ii) $H_1: \mu_{\text{Sem}} \neq \mu_{\text{Com}}$. Os valores relativos ao teste ANOVA aplicado a este factor podem ser consultados nas Tabelas B79 a B102 do Anexo B.

Os resultados obtidos em todos os métodos originaram um valor de $p > 0,01$, sugerindo a aceitação da hipótese nula, H_0 .

3.3.5 Aromas

Algumas cervejas apresentavam aromas na sua constituição. Considerando a baixa ocorrência do mesmo aroma no mercado, optou-se por definir apenas dois grupos: com ou sem aroma adicionado. As hipóteses formuladas para o teste F foram, por isso, $H_0: \mu_{\text{Sem}} = \mu_{\text{Com}}$ ou $H_1: \mu_{\text{Sem}} \neq \mu_{\text{Com}}$. Os valores mais relevantes do teste ANOVA relativo a este factor podem ser consultados nas tabelas B103 a B126 do Anexo B.

Para os métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC o teste F forneceu um valor de p superior a 0,01. Este resultado sugeriu a aceitação da hipótese H_0 , indicando a ausência de diferenças estatísticas entre a CA média fornecida pelas cervejas com e sem aroma.

3.3.6 Antioxidantes

Relativamente ao antioxidante, as amostras foram agrupadas em dois grupos distintos: com antioxidante ou sem antioxidante. Neste estudo as hipóteses formuladas para o teste F foram $H_0: \mu_{\text{Sem}} = \mu_{\text{Com}}$ ou $H_1: \mu_{\text{Sem}} \neq \mu_{\text{Com}}$. Os dados estatísticos relativos ao estudo do efeito do antioxidante podem ser encontrados no Anexo B, tabelas B127 a B150.

O teste F forneceu, para os métodos todos os métodos, um valor de p superior a 0,01, levando à aceitação da hipótese H_0 . Tal como para os aromas, os resultados apontam para a ausência de diferenças estatísticas entre as médias dos grupos com e sem antioxidante.

3.3.7 Edulcorantes

À semelhança dos factores anteriores, os grupos constituídos para os edulcorantes foram dois: as amostras com edulcorante e as amostras sem este constituinte. Neste sentido, as hipóteses formuladas para o teste F foram $H_0: \mu_{Com} = \mu_{Sem}$ ou $H_1: \mu_{Com} \neq \mu_{Sem}$. Os valores estatísticos relativos ao estudo encontram-se no Anexo B, tabelas B151 a B174.

Os resultados de CA relativos a todos os métodos estudados forneceram um valor de $p > 0,01$. Este resultado sugere, mais uma vez, a aceitação da hipótese H_0 e sugere a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos observados.

3.3.8 Teor de álcool

De modo similar ao indicado para os factores anteriores, foram simuladas hipóteses relativas à possível igualdade ou diferença entre as médias de CA de cada grupo de cervejas de determinado teor de álcool ($H_0: \mu_{0\%} = \mu_{4\%} = \mu_{5\%} = \mu_{6\%} = \mu_{7\%} = \mu_{8\%}$ ou $H_1: \mu_{0\%} \neq \mu_{4\%} \neq \mu_{5\%} \neq \mu_{6\%} \neq \mu_{7\%} \neq \mu_{8\%}$). Os valores estatísticos relativos ao estudo deste factor podem ser encontrados no Anexo B, tabelas B175 a B204.

Os valores dos métodos TRAP, TEAC, DPPH e ORAC forneceram valores de p superiores a 0,01, o que levou à aceitação da hipótese H_0 . O teste ANOVA confirmou este registo e agrupou os vários teores de álcool num único subconjunto homogéneo de médias.

O método FRAP para o padrão AA e TR e o método ORAC para o padrão AA forneceram valores de p superiores a 0,01, conduzindo à aceitação da hipótese H_0 . O teste ANOVA sugeriu por isso a existência de um só subconjunto homogéneo.

O método FRAP para o padrão AG e o método ORAC para o padrão AG e TR forneceram valores de p inferiores a 0,01, o que levou à rejeição da hipótese H_0 . O teste ANOVA confirmou estes registos. Este teste sugeriu para o método FRAP com padrão AG, dois subgrupos homogéneos de médias, em que as amostras com 8 e 6 % de álcool se incluíam em grupos diferentes. Relativamente ao método ORAC, para os padrões AG e TR, existem também dois subgrupos distintos em que as cervejas com 4% e 8% de álcool pertencem a subgrupos diferentes.

3.3.9 Cor

Os grupos de amostras foram cinco, e as hipóteses formuladas para o teste F foram: $H_0: \mu_{preta} = \mu_{dourada} = \mu_{castanha\ avermelhada} = \mu_{vermelha} = \mu_{âmbar}$ ou $H_1: \mu_{preta} \neq \mu_{dourada} \neq \mu_{castanha\ avermelhada} \neq \mu_{vermelha} \neq \mu_{âmbar}$. Os resultados mais relevantes deste estudo estatístico podem ser encontrados nas tabelas B205 a B234, Anexo B.

Para o método TRAP, TEAC e CUPRAC o valor de p do teste F foi menor que 0,01, o que levou à aceitação da hipótese H_1 . O teste ANOVA sugeriu, por isso, dois subconjuntos homogêneos de médias. A cor dourada apresentou diferenças estatisticamente significativas relativamente à cor castanho-avermelhada no método TRAP e TEAC. Esta última apresentou as CA mais elevadas.

O método CUPRAC apresentou resultados similares, embora neste caso as cervejas de cor preta e castanho-avermelhada apresentassem diferenças estatisticamente significativas das cervejas de cor dourada. As cores preta e castanho avermelhada apresentaram valores de CA mais elevados do que as restantes cores.

Os métodos DPPH, com o padrão AA, e FRAP, com o padrão AG, apresentaram, também, valores de p inferiores a 0,01. O teste ANOVA confirmou estes resultados, verificando-se a existência de dois subgrupos homogêneos de médias. No método DPPH concluiu-se que existiam diferenças estatisticamente entre as cervejas de cor dourada e as pretas em que as últimas apresentaram uma maior CA. No método FRAP verificou-se que as cervejas de cor âmbar e castanho avermelhadas pertenciam a um subgrupo distinto das restantes, apresentando uma CA superior.

3.3.10 Sumos

As hipóteses formuladas para o teste F relativamente ao sumo adicionado foram (i) $H_0: \mu_{Sem} = \mu_{Com}$ e (ii) $H_1: \mu_{Sem} \neq \mu_{Com}$. Para os métodos TRAP e TEAC, o teste F forneceu um valor de p superior a 0,01 o que levou à aceitação da hipótese H_0 . Os resultados mais relevantes deste estudo estatístico podem ser consultados nas tabelas B235 a B258, Anexo B.

Todos os métodos estudados forneceram um valor de p superior a 0,01 para o teste F, levando à aceitação da hipótese H_0 . Concluiu-se, por isso, que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos constituídos.

3.3.11 “Outros Aditivos”

Relativamente ao factor designado por “outros aditivos”, as hipóteses formuladas para o teste F foram (i) $H_0: \mu_{Sem} = \mu_{Com}$ e (ii) $H_1: \mu_{Sem} \neq \mu_{Com}$. O teste F forneceu, para os métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC um valor de p superior a 0,01, levando à aceitação da hipótese H_0 .

Os resultados mais relevantes deste estudo estatístico podem ser consultados nas tabelas B259 a B282, Anexo B.

3.4 Efeito do método

Considerando que uma mesma amostra analisada por vários métodos originou valores consideravelmente diferentes, considerou-se importante avaliar o efeito do método. Para isso, e tal como efectuado anteriormente, procedeu-se à análise estatística dos resultados através do teste ANOVA.

O efeito dos métodos foi testado individualmente para cada padrão, uma vez que os resultados obtidos para os vários padrões eram muito díspares e incomparáveis. Em todos os casos, o teste de *Shapiro-Wilk* confirmou a normalidade dos resultados (Tabelas C1 a C3, Anexo C). Seguindo o pressuposto de *Everitt*, ignorou-se a possível violação da homocedasticidade (Tabelas C4 a C6, Anexo C).

Os valores de estatística descritiva (Tabela C7 a C9, Anexo C) mostraram que a CA média foi muito superior para o método ORAC, relativamente aos restantes métodos, e que a CA média do método DPPH foi substancialmente inferior. Os restantes métodos, TRAP, TEAC e FRAP apresentaram CA médias muito semelhantes.

As amplitudes de variação de CA podem ser observadas na caixa de bigodes representada na Figura 39. A amplitude de variação dos valores de CA decorrentes do método ORAC foi muito superior à encontrada para os restantes métodos.

Neste estudo ANOVA pretendeu-se determinar se o valor de CA foi igual para qualquer método, utilizando-se para esse efeito o teste F. As hipóteses formuladas foram: (i) $H_0: \mu_{FRAP} = \mu_{TEAC} = \mu_{TRAP} = \mu_{DPPH} = \mu_{CUPRAC} = \mu_{ORAC}$ e (ii) $H_1: \mu_{FRAP} \neq \mu_{TEAC} \neq \mu_{TRAP} \neq \mu_{DPPH} \neq \mu_{CUPRAC} \neq \mu_{ORAC}$. O teste F forneceu um valor de p inferior a 0,01 o que levou à rejeição da hipótese H_0 (Tabelas C10 a C12, Anexo C).

A rejeição da hipótese nula foi acompanhada pela existência de pelo menos um dos grupos com valores de CA diferente dos restantes. Os resultados sugeriram a existência de diferenças significativas entre o método ORAC e os restantes, apresentando o método ORAC valores mais elevados do que os restantes métodos (Tabela C13 a C15, Anexo C).

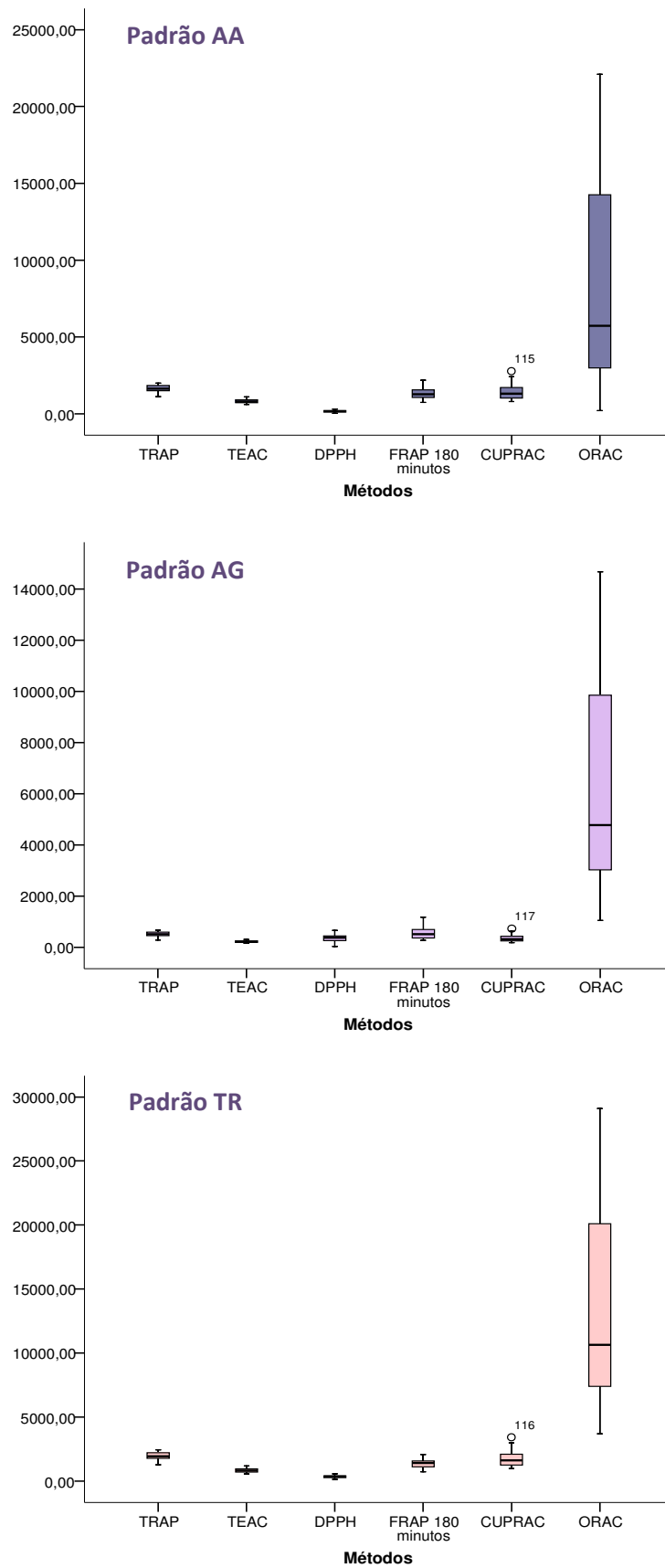


Figura 39 – Caixa de bigodes de valores de CA para os métodos estudados com os padrões AA, AG e TR.

3.5 Efeito do padrão

O efeito dos padrões foi testado individualmente para cada método, uma vez que os resultados obtidos para os vários padrões eram muito díspares e incomparáveis. De igual modo, verificaram-se os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade para a aplicação do teste ANOVA (Tabelas D1 a D12, Anexo D).

A violação da homocedasticidade foi baseada no pressuposto de *Everitt*. Todos os dados estatísticos correspondentes podem ser consultados nas Tabelas D13 a D18, Anexo D.

As amplitudes de variação de CA podem ser observadas nas caixas de bigodes representadas na Figura 40 e 41. Verificou-se que os padrões AA e TR têm CA mais elevadas que o padrão AG em todos os métodos, excepto no método DPPH, em que o padrão AG demonstrou ter uma CA mais elevada que os restantes.

Neste estudo ANOVA pretendeu-se determinar se o valor de CA foi igual para qualquer método, utilizando-se para esse efeito o teste F. As hipóteses formuladas para este teste foram: (i) $H_0: \mu_{AA} = \mu_{AG} = \mu_{TR}$ e (ii) $H_1: \mu_{AA} \neq \mu_{AG} \neq \mu_{TR}$. O teste F forneceu um valor de p inferior a 0,01 para todos os métodos, o que levou à rejeição da hipótese H_0 (Tabelas D19 a D24, Anexo D).

Entre as médias observadas, o teste ANOVA estabeleceu pelo menos um grupo com valores de CA diferente dos restantes. Para os métodos TEAC, FRAP e DPPH o padrão AG apresentou diferenças estatisticamente significativas relativamente aos padrões AA e TR, embora nos métodos TEAC e FRAP o padrão AG fosse o padrão com CA inferior e no método DPPH o padrão com CA superior. Para o método ORAC, e de modo semelhante aos anteriores, o teste ANOVA propôs a existência de pelo menos um dos grupos com valores de CA diferente dos restantes, indicando que os valores produzidos pelo padrão TR foram estatisticamente diferentes e superiores aos encontrados para os restantes padrões.

Nos métodos TRAP e CUPRAC encontraram-se 3 subconjuntos homogêneos de médias, indicando a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de CA fornecidos por cada um dos padrões utilizados.

Os resultados mais relevantes deste estudo estatístico podem ser consultados nas Tabelas D1 a D30, Anexo D.

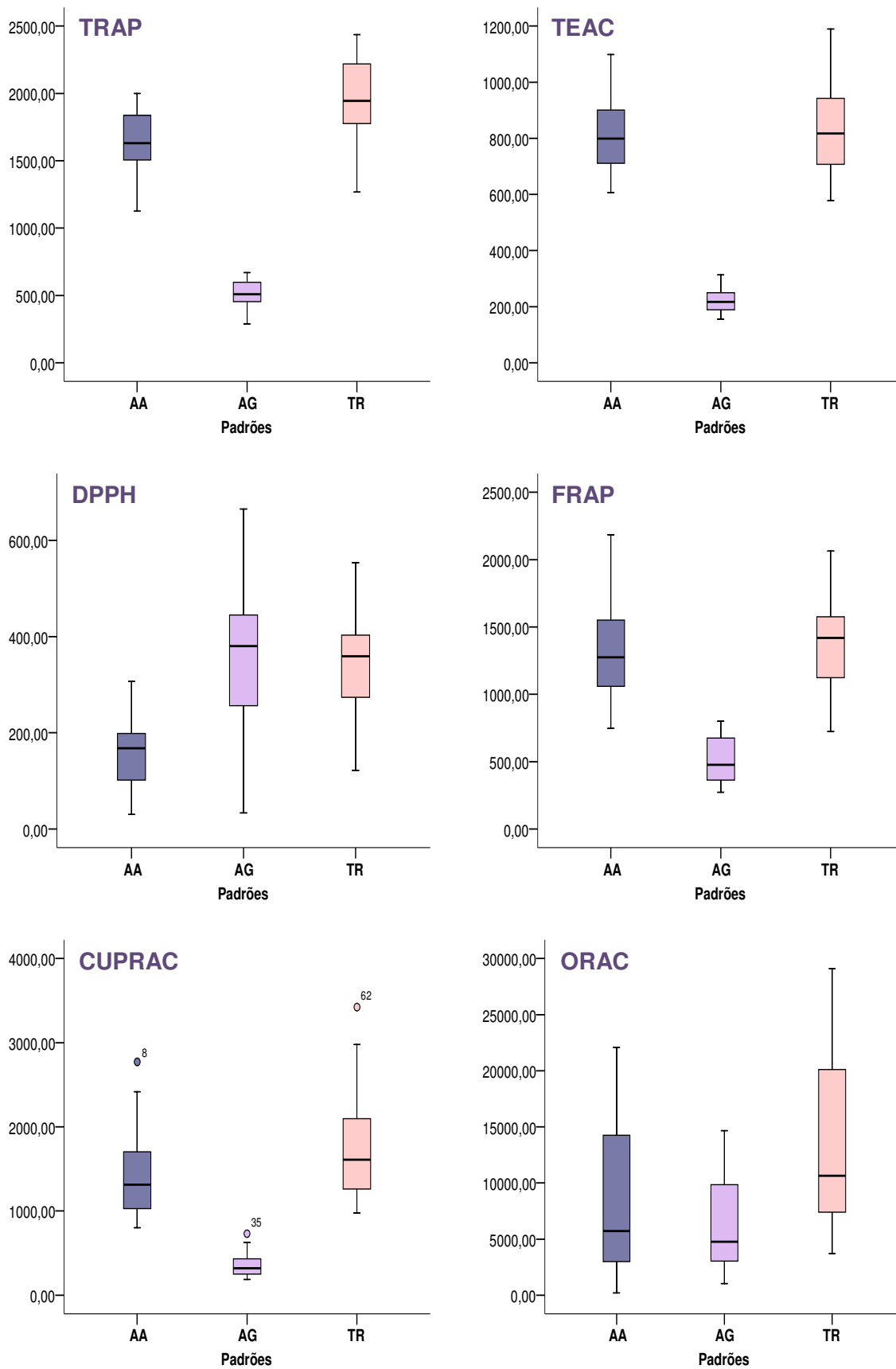


Figura 40 – Caixa de bigodes de valores de CA para os padrões estudados com os métodos TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC.

4. Conclusões

Neste trabalho estudaram-se vários métodos (TRAP, TEAC, DPPH, FRAP, CUPRAC e ORAC) com base em três padrões distintos (AA, AG e TR). A análise descritiva indicou que o método ORAC forneceu valores de CA mais elevados; com o método DPPH as CA obtidas foram substancialmente inferiores aos restantes métodos, sendo os restantes muito semelhantes entre si.

Relativamente aos diferentes padrões estudados, o TR foi o padrão com o qual se obtiveram CA mais elevadas, independentemente do método ou do padrão estudado. O AG foi, para todos os métodos, com excepção do DPPH, o padrão com o qual se obtiveram CA mais reduzidas. No método DPPH o AA foi o padrão com o qual se obtiveram valores mais baixos.

As análises foram aplicadas a várias cervejas, diferentes entre si relativamente à marca comercial, tipo, origem, corantes, aromas, edulcorantes, antioxidantes, acidificantes, cor, teor de álcool, sumo e outros aditivos que consistiam em aditivos que não se enquadravam nos restantes parâmetros. A análise descritiva dos parâmetros supracitados mostrou que marca comercial D foi a que atingiu valores de CA média mais elevados, seguida da marca comercial C. As marcas A e B estiveram muito próximas entre si. Nos métodos TRAP, TEAC, DPPH e FRAP a marca B obteve valores de CA média ligeiramente superiores à marca A, enquanto nos métodos CUPRAC e ORAC ocorreu o inverso. As cervejas das marcas E, F G e H tiveram valores de CA mais baixos em todos os métodos.

As cervejas do tipo *Ale* tiveram uma CA média ligeiramente superior às cervejas do tipo *Lager* para todos os métodos e padrões estudados. As cervejas de origem Portuguesa demonstraram ter uma CA média ligeiramente inferior às Belgas, independentemente do método ou padrão.

As amostras com corante apresentaram uma CA média superior às que não continham corante em todos os métodos, excepto no método ORAC, para o qual forneceu o resultado inverso. A diferença entre as CA das amostras com e sem corantes foi muito semelhante em todos os métodos.

As amostras com edulcorantes, aromas, sumo, antioxidantes e outros aditivos têm uma CA média superior à das amostras que não os contêm, apesar da diferença observada ser pouco significativa.

As amostras de cor castanha-avermelhada apresentaram uma CA média superior às restantes, sendo seguidas pelas amostras de cor âmbar, vermelha, preta e dourada.

Relativamente ao teor de álcool na cerveja os resultados indicaram para as cervejas com 7 e 8 % valores CA mais elevadas do que para as amostras com 0, 4, 5 e 6 %. Estas últimas apresentaram valores de CA muito próximos entre si.

De uma forma geral, a análise descritiva indicou valores de CA diferentes para as várias amostras estudadas, variando estas com o método e o padrão utilizados. A análise estatística destes dados sugeriu que alguns aspectos intrínsecos às amostras e ao procedimento experimental poderiam originar diferenças estatísticas nas CA observadas.

A marca comercial da cerveja não pareceu ser um factor determinante, já que apenas 1/3 dos métodos forneceu alguma diferença estatística entre as marcas estudadas. O mesmo se poderia afirmar relativamente à origem e ao teor de álcool nas cervejas e ao padrão utilizado no método. Relativamente à cor, a maioria dos métodos sugere diferenças estatísticas para os diferentes grupos. Poder-se-ia divagar acerca da possível interferência da cor nos métodos ópticos ensaiados... Porém, a diluição utilizada foi demasiado elevada para evidenciar esta possibilidade. Os factores corante, aromas, antioxidantes, edulcorantes, sumos e outros aditivos não exerceram um efeito diferenciador, pelo menos do ponto de vista estatístico, na CA das amostras. O único factor claramente determinante foi o método utilizado, dado que o método ORAC forneceu sempre os valores de CA mais elevados.

5. Bibliografia

- [1] <http://www.unicer.pt/gca/index.php?id=226>, acessado a 19 de Fevereiro de 2008.
- [2] http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/biotecnologia/Histor.htm, acessado a 19 de Fevereiro de 2008.
- [3] <http://www.ibesa.pt/documentos/arquivo/simposiocs/ibdia0004.pdf>, acessado a 17 de Março de 2008.
- [4] http://www.ff.uc.pt/~mccast/nutricao/material/Cerveja_Saude.pdf, acessado a 19 de Fevereiro de 2008.
- [5] http://www.apcv.pt/asp/docs_cerveja/49.pdf, acessado a 19 de Fevereiro de 2008.
- [6] Apontamentos de Bioengenharia – Dr. Eduardo Soares.
- [7] <http://www.cervejasdomundo.com/Ingredientes.htm>, acessado a 19 de Fevereiro de 2008.
- [8] <http://www.britannica.com/eb/art/print?id=70929&articleTypeld=1>, acessado a 18 de Março de 2008.
- [9] Ghiselli A., Serafini M., N. F., Scaccini C.; Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data; *Free Radical Biology Medicine* 29 (2000):1106-1114.
- [10] Cooke Marcus S., Olinsky R., Evans M.; Does measurement of oxidative damaged to DNA have clinical significance?; *Clinica Chimica Acta* 365 (2006) 30-49.
- [11] Milner, J. A., New Insights into the Mechanism of Action of Antioxidants, Nutrition Science Research Group, Division of Cancer Prevention; *Nutrition and Cancer* 41 (2000) 1 – 16.
- [12] Huang D., Ou B., Prior R.L.; The Chemistry behind antioxidant capacity assays; *Journal of Agriculture and food chemistry* 53 (2005) 1841-1856.
- [13] Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F.; Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils

Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays; *The Journal for Nutrition* (2003) 2812-2819.

[14] Resat A., Kubilay G., Birsen D., Mustafa Ö., Saliha E., Çelik, B. Bektaşoğlu, K. Işıl B. and Dilek Ö.; Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay; *Molecules* 12 (2007) 1496-1547.

[15] Ou B., Huang D., Woodill M. H., Flanagan Judith A., Deemer E., Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study; *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50 (2002) 3122-3128.

[16] Vasconcelos S., Goulart M., Moura J., Benfato V., Kubota L., Espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação; *Química Nova* 30 (2007) 1323-1338.

[17] Pestana M. H., Gageiro, J. N.; *Análise de dados para ciências sociais – A complementaridade do SPSS*; Edições Silabo; 4ª Edição; Lisboa; 2005.