UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Gustavo Tokoro Riether

**Aspectos do mecanismo de formação 3-metil-2-buten-1-ol em cerveja e a
reatividade dos iso- α -ácidos**

São Carlos, 2010

Gustavo Tokoro Riether

Aspectos do mecanismo de formação 3-metil-2-buten-1-ol em cerveja e a reatividade dos iso- α -ácidos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos, 2010

Ao meu avô Roberto e minha madrinha de
formatura, sua esposa, Elisabeth pelo apoio,
pelo incentivo e pelo encorajamento científico.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela oportunidade de poder aprender mais sobre área de meu interesse.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e ao Eduardo Sanches (Balinha) pela disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos de ressonância magnética nuclear.

Ao Sr. Júlio Landmann (Malteria do Vale S/A; Hopsteiner) pela gentileza de doar o extrato de iso- α -ácidos.

À Prof^a. Paula Homem de Mello pela execução dos cálculos teóricos.

A minha família e minha namorada Eliane pelo apoio, incentivo, descontração.

Aos meus amigos de velhos tempos e meus amigos do Laboratório Química Inorgânica e Analítica e do Laboratório de Química da Aguardente.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade de São Paulo pela oportunidade.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

*Celui qui vient au monde pour ne rien troubler,
ne mérite ni regards, ni patience - René Charr
(Aquele que vem ao mundo para nada perturbar,
não merece nem atenção, nem paciência)*

RESUMO

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada derivada do amido e aromatizada com lúpulo (*Humulus lupulus L.*). Os α -ácidos são extraídos do cone do lúpulo e durante o processo de cozimento do mosto são isomerizados em iso- α -ácidos (IAAs), na configuração *cis*- e *trans*-, conferindo qualidade de espuma e sabor amargo característico da cerveja. Neste trabalho, é reportado que IAAs sofrem degradação fotossensibilizada por flavinas ($\Phi = 4,8 \times 10^{-3}$ mol einstein⁻¹), mesmo na presença de compostos fenólicos (ácido ferúlico, $\Phi = 2,0 \times 10^{-3}$ mol einstein⁻¹) em excesso molar de 10 vezes, sugerindo que radicais formados pela desativação do estado tripleto excitado da riboflavina por compostos fenólicos possam também estar envolvidos na degradação dos IAAs. Foram identificados dímeros e trímeros derivados do ácido ferúlico e p-coumárico através de LC-ESI-IT-MS como principais fotoprodutos de degradação dos compostos fenólicos. Reportamos a reatividade dos diferentes diastereoisômeros de iso- α -ácidos frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), como modelo de radical peroxila, $k_2 = 0,41$ e $1,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a reação com *cis*-IAA e *trans*-IAA em meio de etanol acidificado com 1 % ácido fórmico a temperatura de 25 °C, respectivamente. Estas constantes de velocidade específica sugerem que a degradação dos ácidos amargos via reação térmica em processo radicalar é importante no armazenamento do produto já que as constantes de velocidade de reação dos IAAs com o radical DPPH• são competitivas com as observadas para as reações de antioxidantes naturalmente presentes na cerveja com o radical DPPH• ([ácido ferúlico] = 0,2mg/L_{cerveja}; $k_2 = 1,18 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A análise dos dados termodinâmicos (Mistura de IAAs, $\Delta H^\ddagger = 25 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = -155 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) sugere um mecanismo de oxidação dos IAAs pelo radical DPPH• via HAT/PCET. A diferença de reatividade observada para os diastereoisômeros (*cis/trans*) está aparentemente relacionada ao arranjo estereoquímico dos grupos laterais isohexonoil e prenil conectados aos carbonos C(4) e C(5), respectivamente. Desta forma, sugere-se que a proximidade espacial

dos sítios de insaturação na espécie *trans*- ocasiona um aumento na densidade eletrônica ou um fator apenas estatístico já que os H-alílicos estão próximos espacialmente, favorecendo desta forma a oxidação via radicalóide.

ABSTRACT

Beer is a fermented alcoholic beverage based on starch and flavored by hops (*Humulus lupulus* L.). The α -acids are extracted from hop cones and isomerize into iso- α -acids (IAAs) during the wort boiling, in *cis*- and *trans*- configuration, providing foam quality and the characteristic bitter taste of beer. In this work, is reported that these compounds undergo degradation photosensitized by flavins ($\Phi = 4,8 \times 10^{-3}$ mol einstein⁻¹), even in the presence of phenolic compounds (ferulic acid, $\Phi = 2,0 \times 10^{-3}$ mol einstein⁻¹) in 10-fold molar excess, suggesting that radicals formed during the deactivation of triplet excited state of riboflavin by phenolic compounds may be involved in the degradation of IAAs. Dimers and trimers derived from ferulic and p-coumaric acids were identified by LC-ESI-IT-MS as the main photoproducts of the phenolic compounds. We report the reactivity of the different diastereoisomers of IAAs towards the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radical, as a model for peroxy radical, $k_2 = 0,41 \text{ e } 1,3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the reaction with *cis*-IAA and *trans*-IAA in ethanol acidified with 1% of formic acid, at the temperature of 25 °C, respectively. These specific rate constants suggest that the degradation of the bitter acids via thermal reactions in an radicaloid process is important during the storage of the product since the reaction rate constant for IAAs and the DPPH• radical are competitive with the reaction rate constants for naturally occurring antioxidants in beer with the DPPH• radical ([ferulic acid] = 0,2mg/L_{beer}; $k_2 = 1,18 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The analysis of the thermodynamical data (IAAs mixture, $\Delta H^\ddagger = 25 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = -155 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) suggest a HAT/PCET oxidation mechanism of IAAs by DPPH• radical. The difference of reactivity observed for the diastereoisomers (*cis*-/*trans*-) is possibly related to the stereochemical arrangement of the isohexenoyl and prenyl side chains connected to C(4) and C(5) carbons, respectively. In this way, is suggested that the spatial proximity of the insaturation sites in the *trans*- species lead to a increase in

electronic density or due to a statistical factor since the allylic-H are close spatially, which favors the oxidation via radicaloid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo médio anual de cerveja per capita por país e panorama geral do mercado de bebidas alcoólicas no Brasil.....	19
Figura 2. Isomerização térmica de humulonas à <i>cis</i> - e <i>trans</i> - isohumulonas durante o cozimento do mosto fermentado e adicionado de lúpulo. A relação <i>trans</i> -isohumulona : <i>cis</i> -isohumulona em condições normais de fabricação da cerveja é de 32 : 68.	22
Figura 3. a) Perfil de transmissão de radiação luminosa de diferentes recipientes de vidro para armazenamento de cerveja e b) formação de MBT em cerveja do tipo pilsen durante a iluminação em diferentes recipientes de vidro. A) garrafa transparente; B), C) e D) garrafa verde; E) garrafa marrom. Adaptado de Sakuma S. et al.).	22
Figura 4. Foto-excitação da riboflavina ao estado tripleto-excitado.	23
Figura 5. Mecanismos de atuação da Riboflavina como fotossensibilizador. Tipo I: oxidação de um substrato e formação de íon superóxido por transferência de elétron a partir do radical neutro da riboflavina; Tipo II: desativação física do estado tripleto excitado por transferência de energia e geração de oxigênio singleto excitado.	25
Figura 6. Mecanismo de formação de MBT através da degradação das isohumulonas em cerveja durante exposição à luz proposto por Huvaere <i>et al.</i> ¹⁷ . RF = riboflavina, RFH [•] = riboflavina radical, e ET = transferência de elétrons.....	26
Figura 7. Estrutura do 3-metil-but-2-eno-1-tiol, MBT.....	27
Figura 8. Estrutura química das isohumulonas e seus derivados sintéticos reduzidos ¹³	28
Figura 9. Proposta de mecanismo para formação de radicais derivados das <i>trans</i> -isohumulonas pela sua direta absorção de luz na região de UV ²²	29
Figura 10. Mecanismo proposto por Huvaere <i>et al.</i> ²³ para a decomposição de iso- α -ácidos dihidrogenados em cerveja sob condições de fotooxidação sensibilizada pela riboflavina.	30

Figura 11. Desativação química do estado tripleto excitado de flavinas e formação do radical fenoxila. Mecanismo de fotooxidação do Tipo II.....	33
Figura 12. Estrutura do radical DPPH•.	33
Figura 13. Reação de geração de radical superóxido via fotoquímica.	40
Figura 14. UV-Vis da espécie Citc-Fe(III) e Citc (II) redução do centro metálico do citocromo C pelo íon superóxido.....	40
Figura 15. Reação de geração química de superóxido via xantina/xantina oxidase. XO = xantina oxidase.	41
Figura 16. Equilíbrio ácido-base dos iso- α -ácidos.	45
Figura 17. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1 = cis-co-isohumulona e trans-co-isohumulona; Picos 2 = n-/ad-isohumulonas; (b) Espectro de massas dos Picos 1; (b) Espectro de massas dos Picos 2.....	51
Figura 18. Estrutura do ácido p-coumárico, $[M-H]^- = 163$ m/z.....	51
Figura 19. Estrutura do ácido ferúlico, $[M-H]^- = 193$ m/z.	52
Figura 20. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1, 2, 3, 4 e 5 = produtos de degradação do IAAs na presença de ácido p-coumárico e oxigênio; (b), (c), (d), (e) e (f) Espectros de massas dos picos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente e as possíveis estruturas dos íons indicados.....	53
Figura 21. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1 e 2 produtos de degradação do IAAs na presença de ácido ferúlico e oxigênio; (a) e (b) Espectros de massas dos picos indicados no cromatograma e possíveis estruturas dos íons indicados nos espectros.	54
Figura 22. MS ² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) $[M-H]^- = 325$ e (c) $[M-H]^- = 237$, em (d) um esquema de fragmentação do dímero formado durante a fotodegradação.	55
Figura 23. MS ² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) $[M-H]^- = 281$ e (c) $[M-H]^- = 211$, em (d) um esquema proposto de fragmentação do fotoproduto.....	56

Figura 24. MS ² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) [M-H] ⁻ = 443 e (c) [M-H] ⁻ = 281, em (d) um esquema proposto de fragmentação do foto-produto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido à disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.	57
Figura 25. MS ² do segundo pico mais intenso em (a), mostrado em (b) [M-H] ⁻ = 487, em (c) um esquema proposto de fragmentação do foto-produto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido a disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.	58
Figura 26. MS ² do segundo pico mais intenso em (a), mostrado em (b) [M-H] ⁻ = 399, em (c) um esquema proposto de fragmentação do fotoproduto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido a disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.	59
Figura 27. Dimerização proposta do ácido p-coumárico em orto- ao grupo fenol.....	60
Figura 28. Banda de Eluição do ácido p-coumárico nas amostras: (Boi) Amostra com oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Bn) Amostra não irradiada; (Bsi) Amostra sem oxigênio, irradiada por 30 minutos.....	61
Figura 29. Banda de eluição do ácido ferúlico nas amostras: (Csi) Amostra sem oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Coi) Amostra com oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Cn) Amostra não irradiada.	61
Figura 30. Espectro da reação do radical íon superóxido com IAAs, feito pelo método de pulso de laser, fotossensibilizado por [FMN]= 0,5 mmol L ⁻¹ , com [DTPA]= 1,0 mmol L ⁻¹ e [Ferricitocromo-C]= 0,02 mmol L ⁻¹	63
Figura 31. Espectro da reação do radical íon superóxido feita com xantina/xantina oxidase. [XO] = 0,02 U mL ⁻¹ ; [xantina] = 0,1 mmol L ⁻¹ ; [Ferricitocromo-C] = 0,02 mmol L ⁻¹	63
Figura 32. Ilustração esquemática da separação dos diastereoisômeros por complexação seletiva com β-ciclodextrina.....	64

Figura 33. Espectro eletrônico de absorção UV-Vis das isohumulonas. (a) etanol:NaOH 2 mol L ⁻¹ (10:1 V/V); (b) etanol:HCl 2 mol L ⁻¹ (10:1 V/V).....	65
Figura 34. Espectro de ¹ H RMN dos <i>trans</i> -iso- α -ácidos isolados.....	66
Figura 35. Espectro de ¹ H RMN dos <i>cis</i> -iso- α -ácidos isolados. O asterisco indica impurezas na amostra.....	66
Figura 36. Cromatograma das <i>trans</i> -isohumulonas (em azul) e da solução comercial de IAAs (em vermelho). Pico 1: <i>cis</i> -co-isohumulona; pico 2: <i>trans</i> -co-isohumulona; pico 3: <i>cis</i> -n-isohumulona e <i>cis</i> -ad-isohumulona; pico 4: <i>trans</i> -n-isohumulona e <i>trans</i> -ad-isohumulona. ..	68
Figura 37. Curva de titulação espectrofotométrica, ilustrando a supressão do pico na região de 520 nm, referente ao radical DPPH•. Com concentrações iniciais de [<i>trans</i> -isohumulonas] = 0,78 mmol L ⁻¹ e [DPPH•] = 0,08 mmol L ⁻¹ em etanol:1% de ácido fórmico.	70
Figura 38. Cinética de reação a 25 °C (298 K) fixando a concentração de DPPH (3,0.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) e variando a concentração dos IAAs ((0,66; 0,82; 0,98; 1,15; 1,31).10 ⁻³ mol L ⁻¹) em etanol com 1% de ácido fórmico.	71
Figura 39. Gráfico de k _{obs} vs. concentração de IAA ((1,00; 1,25; 1,51; 1,76; 2,01).10 ⁻³ mol L ⁻¹) em etanol com 1% de ácido fórmico a temperatura de 25 ± 0,2 °C.....	72
Figura 40. Gráfico de Eyring. Cada ponto no gráfico corresponde à análise em triplicata.....	72
Figura 41. Arranjo espacial da molécula (A) <i>cis</i> -isohumulona e (B) <i>trans</i> -isohumulona obtido após cálculos de dinâmica molecular.	75
Figura 42. Gráfico de contorno para o orbital molecular virtual ocupado de mais alta energia (HOMO) para as estruturas otimizadas da (A) <i>cis</i> -isohumulona e da (B) <i>trans</i> -isohumulona.	76
Figura 43. Cromatograma obtido após o término da reação entre as <i>trans</i> -isohumulonas e o radical DPPH• em etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C. Linha azul: obtido para uma mistura reacional contendo 1,2 mmol L ⁻¹ de <i>trans</i> -isohumulonas e 0,12 mmol L ⁻¹ de DPPH•. Linha vermelho: obtido para uma mistura reacional contendo 1,2 mmol L ⁻¹ <i>trans</i> -	

isohumulonas e $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de DPPH•. (a) Cromatograma total; (b) Detalhe dos picos 1 a 8; (c) Detalhe dos picos 9 a 14; (d) Detalhe dos picos 14 a 16..... 79

Figura 44. Espectro UV-Vis indicando o término da reação (após 24 h) das *trans*-isohumulonas com DPPH•, devido à ausência de absorção em 520 nm. 80

Figura 45. Cromatograma obtido após o término da reação entre as *trans*-isohumulonas e o radical DPPH• em etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C em condições de pseudo-primeira ordem. (a) Cromatograma de íon total; (b) Cromatograma de íon extraído: 410 m/z (verde); 394 m/z (vermelho); 439 m/z (azul). 81

Figura 46. Espectro de diferença de absorbância da curva de titulação espectrofotométrica dos IAAs com o radical DPPH•..... 82

Figura 47. Cromatograma de íon total obtido após a reação das *trans*-isohumulonas com o radical DPPH• (azul) etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C; Cromatograma de íon total somente das *trans*-isohumulonas (vermelho). 83

Figura 48. Espectros de massa referentes ao pico 1 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 379 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 447 m/z..... 84

Figura 49. Espectros de massa referentes ao pico 2 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 445 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 377 m/z..... 85

Figura 50. Espectros de massa referentes ao pico 3 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 393 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 379 m/z..... 86

Figura 51. Espectros de massa referentes ao pico 4 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 461

m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 393 m/z; (d) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 365 m/z. 87

Figura 52. Estrutura do produto de degradação térmica dos IAAs, com $[M-H]^- = 365 \text{ m/z}$ ⁵⁶.87

Figura 53. Espectros de massa referentes ao pico 5 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 410 m/z; 88

Figura 54. Espectro de absorção de radiação UV-Vis da riboflavina, o pico de 440 nm foi o utilizado nos experimentos. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constante de velocidade específica para a desativação química do estado tripleto excitado da riboflavina e concentração do supressor necessária para desativar 90 % do estado tripleto excitado ²⁶	31
Tabela 2. Composição da mistura de IAAs, calculada através de análise cromatográfica.....	48
Tabela 3. Resultados da degradação dos IAAs fotossensibilizada por riboflavina	49
Tabela 4. Constantes de velocidade específica de reação das isohumulonas com o radical DPPH•, em diferentes temperaturas e os respectivos parâmetros de ativação da reação.....	74
Tabela 5. Áreas e identidades dos picos marcados na Figura 41.....	80
Tabela 6. Rendimentos quânticos da reação de degradação da L-metionina, fotossensibilizada por FMN, irradiado por 30 minutos.....	90

LISTA DE ABREVIATURA

- DPPH• - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- IAAs - Iso- α -ácidos
- MBT - 3-metil-but-2-eno-1-tiol
- FMN - riboflavina 5'-monofosfato de sódio
- DTPA - ácido dietilenotriaminopentacético
- ISC - Cruzamento intersistemas
- NHE - Eletrodo normal de hidrogênio
- ArOH - Composto fenólico
- ROO• - Radical fenoxila
- HPLC - Cromatografia líquida de alta performance
- MS - Espectrometria de massas
- ET - Transferência de elétrons
- HAT - Abstração de átomo de hidrogênio
- PCET - Transferência de elétron acoplada com próton
- Rib - Riboflavina
- DMDS - Dimetil dissulfeto
- m/z - Relação massa carga
- [M-H]⁻ - Íon molecular
- ESI - Ionização por eletrospray

ÍNDICE

Resumo	5
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas	15
Lista de Abreviatura	16
Índice	17
1. Introdução	19
1.1. Histórico	19
1.2. A Deterioração da Cerveja	20
1.3. A Degradação das Isohumulonas Fotosensibilizada por Riboflavina	21
1.4. O 3-metil-but-2-eno-1-tiol (MBT).....	26
1.5. Iso- α -ácidos Hidrogenados.....	27
1.6. O Papel dos Compostos Fenólicos Presentes na Cerveja	31
2. Objetivos	35
3. Materiais e métodos	37
3.1. Reagentes.....	37
3.1.1. Síntese do Sal de Parker: Actinômetro Químico	37
3.2. Experimentos de Fotólise	38
3.3. Geração de Superóxido para o Estudo da Reatividade deste Radical Frente aos IAAs	39
3.4. Preparo e Isolamento das <i>trans</i> -isohumulonas e das <i>cis</i> -isohumulonas	41
3.5. Caracterização dos iso- α -ácidos isolados	43
3.6. Capacidade e Atividade Antioxidante	44
3.7. Identificação dos produtos de reação das <i>trans</i> -isohumulonas com o radical DPPH•	46

4. Resultados e Discussão	48
4.1. Fotodegradação de IAAs na Presença de Flavinas.....	48
4.2. Reatividade dos IAAs Frente ao Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	62
4.3. Isolamento e Caracterização das <i>trans</i> -isohumulonas e das <i>cis</i> -isohumulonas	63
4.4. Capacidade e Atividade Antioxidante dos IAAs Frente ao Radical Estável DPPH•	68
4.5. Produtos de degradação das <i>trans</i> -isohumulonas após reação com DPPH•.....	77
4.6. Reatividade da L-metionina com Riboflavina no Estado Tripleto Excitado ($^3\text{FMN}^*$)	89
5. Conclusões	92
Referências	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A cerveja é considerada a bebida alcoólica mais consumida no mundo, com um consumo mundial diário médio em torno de 60 mL per capita e uma produção anual que gira ao redor de $1,22 \cdot 10^6$ hectolitros¹. No Brasil, o consumo per capita é estimado em 49 L por ano, o que representa 66 % do mercado brasileiro de bebidas alcoólicas, **Figura 1**.

Figura 1. Consumo médio anual de cerveja per capita por país e panorama geral do mercado de bebidas alcoólicas no Brasil¹.

A cerveja é definida genericamente como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir de água de boa qualidade, malte de cevada, lúpulo e fermento, podendo ainda ser utilizado outras fontes de carboidratos co-adjuvantes como o arroz, milho e o trigo². O lúpulo (*Humulus lupulus*) foi introduzido na cervejaria durante a Idade Média pelos monges europeus que refinaram as técnicas de produção. Inicialmente, o lúpulo era adicionado como um preservativo de origem natural para que a cerveja pudesse ser estocada por longos períodos, no entanto, passou a ser um agente de aroma essencial e singular da cerveja. A partir da “Reinheitsgebot”, famosa lei da pureza da cerveja promulgada pelo Duque Guilherme IV da Baviera em 1516, que instituiu apenas o uso de malte de cevada, água, lúpulo e fermento como ingredientes para a fabricação da cerveja reforçando o uso do lúpulo no processo de fabricação³.

1.2. A Deterioração da Cerveja

Nos primórdios, a cerveja era em sua grande maioria armazenada em recipientes de cerâmica, porém a partir do século 18 foi introduzido o uso de frascos de vidro para o armazenamento e distribuição da bebida, por serem mais higiênicos, fáceis de limpar, reutilizáveis e de produção simples e barata. A maioria das cervejas passou a ser engarrafada em frascos de vidro que adicionalmente tinham a vantagem de permitir a inspeção visual do conteúdo antes do consumo. No entanto, não foi previsto que a qualidade da cerveja seria afetada pela transparência do recipiente de vidro, se tornando em um verdadeiro pesadelo para os mestres cervejeiros e toda a indústria desta bebida, o qual até hoje está fadado a preocupar os fabricantes de cerveja⁴.

A percepção da deterioração sensorial da cerveja, em particular a formação de um aroma mal cheiroso quando da sua exposição à luz, foi descrita inicialmente em 1875 por

GUSTAVO TOKORO RIETHER

Lintner⁵ e citado por Brand⁶. No entanto, a natureza do composto responsável por este aroma particular designado como '*lightstruck*', '*sunstruck*', '*goût de lumière*' ou '*Sonnengesmack*' permaneceu obscura por muitos anos. Estudos posteriores mostraram que o desenvolvimento deste composto de aroma indesejável era acompanhado por um decréscimo no potencial redox da cerveja e formação de H₂S, sugerindo que mercaptanas, não identificadas na época, deveriam ser os compostos responsáveis por este peculiar aroma indesejado e semelhante ao excretado pelas glândulas anais do gambá^{7, 8, 9}.

1.3. A Degradação das Isohumulonas Fotosensibilizada por Riboflavina

O maior avanço com relação aos aspectos mecanísticos da degradação fotoquímica da cerveja ocorreu no início da década de 60. Quando a pesquisa desenvolvida por Kuroiwa e colaboradores, na cervejaria de Kirin (Japão), demonstraram que as isohumulonas (**Figura 2**), produtos da isomerização térmica das humulonas (metabólitos secundários do lúpulo), eram um fator essencial na formação do composto de aroma indesejável quando a cerveja era exposta à luz. Ao mesmo tempo, foi proposto que o composto 3-metil-but-2-eno-1-tiol (MBT) era o principal composto de aroma formado na cerveja exposta à luz, **Figura 3**, e foi descrito o mecanismo para sua formação a partir das isohumulonas e do H₂S. Ademais, experimentos com a adição de MBT sintético à cerveja fresca resultaram em um aroma considerado idêntico ao da cerveja exposta à luz e a presença do MBT neste tipo de cerveja foi assim demonstrada^{10, 11, 12}.

Figura 2. Isomerização térmica de humulonas à *cis*- e *trans*- isohumulonas durante o cozimento do mosto fermentado e adicionado de lúpulo. A relação *trans*-isohumulona : *cis*-isohumulona em condições normais de fabricação da cerveja é de 32 : 68¹³.

Figura 3. a) Perfil de transmissão de radiação luminosa de diferentes recipientes de vidro para armazenamento de cerveja e b) formação de MBT em cerveja do tipo pilsen durante a iluminação em diferentes recipientes de vidro. A) garrafa transparente; B), C) e D) garrafa verde; E) garrafa marrom. Adaptado de Sakuma S. et al.¹⁴).

Assim, para se entender como ocorre a fotodegradação das isohumulonas é necessário compreender como a riboflavina pode agir como um fotosensibilizador. A riboflavina e as flavinas em geral têm a capacidade de absorver luz na região do visível apresentando valores de absortividade molar consideravelmente alto ($\lambda_{\text{máx}} = 440\text{nm}$; $\epsilon = 10645 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁵ os quais são um indicativo de transições $\pi\text{-}\pi^*$ resultando em estados singletos excitados.

Observa-se que a emissão molecular do estado excitado S_1 ($\lambda_{\text{emissão}} = 530\text{nm}$; $\tau = 5\text{ns}$) é competitiva com o cruzamento intersistemas (ISC) que proporciona a formação do estado metaestável, tripleto excitado, de menor energia e maior tempo de meia vida ($\tau_{1/2} = 15\text{ns}$)^{*}. A **Figura 4** ilustra de maneira esquemática a fotoexcitação da riboflavina e formação do estado tripleto excitado.

Figura 4. Foto-excitação da riboflavina ao estado tripleto-excitado.

O estado tripleto excitado das flavinas decai através de transições radioativas, exibindo fraca emissão de radiação luminosa laranja-vermelho ($\lambda = 610\text{nm}$) a baixas temperaturas. Entretanto, dados obtidos por fotólise por pulso de laser resolvido no tempo

* O rendimento quântico de fluorescência é, neste caso, independente do comprimento de onda de excitação, e a excitação ao mais alto estado singlete ($S_{n>1}$) é seguida por uma rápida conversão interna ao primeiro estado singlete excitado (S_1). Desta forma, pode-se assumir que o ISC para o estado tripleto excitado ($t_{n\geq 1}$) é apenas observado a partir do estado S_1 .

revelam um eficiente cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_{n \geq 1}$) com $\Phi = 0,7^{16}$. Desta maneira, o decaimento não radioativo do estado tripleto excitado é acessível. Ademais, é reportado que o potencial de redução é deslocado de -0,3V vs. NHE para riboflavina no estado fundamental a 1,77V vs. NHE estado tripleto excitado, explicitando assim seu caráter oxidante e decaimento não radioativo.

A riboflavina no estado tripleto excitado pode agir como um oxidante por duas vias, como pode ser observado na **Figura 5**:

- Tipo I: reagindo diretamente com um substrato formando o radical ânion da riboflavina ($pK_a = 6,8$) que reduz o oxigênio molecular ao radical aniônico superóxido;
- Tipo II: sendo desativado por oxigênio molecular, formando oxigênio singleto excitado. O reativo estado singleto excitado do oxigênio[†], formado por transferência de energia da riboflavina no estado tripleto excitado.

[†] O reativo estado singleto excitado do oxigênio, formado por transferência de energia da riboflavina no estado tripleto excitado, é denotado como 1O_2 e possui um dos dois orbitais de fronteira π^* ocupados ($\pi^* \uparrow\downarrow$) e apresenta energia $22,5\text{kcal mol}^{-1}$ superior ao estado fundamental. Entretanto, seu relativo longo tempo de meia vida (3,6 ns em água), eletrofilicidade e a não violação de spin promovem o aumento da reatividade do oxigênio frente a substratos orgânicos;

Figura 5. Mecanismos de atuação da Riboflavina como fotossensibilizador. Tipo I: oxidação de um substrato e formação de íon superóxido por transferência de elétron a partir do radical neutro da riboflavina; Tipo II: desativação física do estado tripleto excitado por transferência de energia e geração de oxigênio singleto excitado.

A **Figura 6** ilustra o mecanismo formal descrito por Kuroiwa e posteriormente modificado por Huvaere et al.¹⁷, para a degradação das isohumulonas (iso- α -ácidos) em cerveja sob condições de fotossensibilização pela riboflavina. Investigações posteriores demonstraram que o grupo tiol do MBT poderia ser originado não somente do H_2S , mas também de aminoácidos sulfurados presentes na cerveja.

Figura 6. Mecanismo de formação de MBT através da degradação das isohumulonas em cerveja durante exposição à luz proposto por Huvare *et al.*¹⁷. RF = riboflavina, $RFH^\bullet$ = riboflavina radical, e ET = transferência de elétrons.

1.4. O 3-metil-but-2-eno-1-tiol (MBT)

O 3-metil-but-2-eno-1-tiol (MBT), também conhecido como prenil mercaptana (**Figura 7**), é um líquido com o ponto de ebulição de 123 - 126 °C¹⁸ e de baixo limiar de sensação (4 ng / litro de cerveja) com seu aroma semelhante ao óleo extremamente mal

cheiroso secretado pelo gambá listrado (*Mustela vison L.*) como defesa contra predadores. No entanto, os tióis predominantes na secreção produzida pelo gambá correspondem ao *trans*-but-2-eno-1-tiol e o 3-metil-butano-1-tiol¹⁹.

Figura 7. Estrutura do 3-metil-but-2-eno-1-tiol, MBT.

Considerando os esforços das cervejarias em proteger a cerveja da luz, pode-se perceber que o aroma gerado pela exposição do produto à luz é considerado um grave defeito organoléptico. Em um estudo de controle de qualidade de cerveja efetuado com um painel sensorialista treinado, o aroma de cerveja exposta à luz apresentou um pronunciado impacto negativo que pode ser considerado como um fator determinante da rejeição do produto pelo consumidor²⁰.

Stephenson e Bamforth²¹ reportaram que existe uma clara preferência da cerveja fresca em relação a cerveja exposta à luz através de dados obtidos por um painel sensorial composto de 33 homens e 16 mulheres. Estes resultados foram distribuídos de acordo com o consumo semanal das pessoas, observando-se que consumidores considerados moderados (duas ou menos garrafas de cerveja) não demonstram clara distinção se gostam ou não de cerveja exposta à luz, enquanto que os consumidores regulares sempre optam pela preferência à cerveja fresca.

1.5. Iso- α -ácidos Hidrogenados

Por muitos anos, o único modo de prevenir o desenvolvimento deste composto de aroma conhecido como “lightstruck flavors” era manter a cerveja ao abrigo da luz. No

entanto, a descrição da proposta de mecanismo de fotodegradação da isohumulona e o melhor conhecimento da reatividade das isohumulonas resultou no desenvolvimento de iso- α -ácidos hidrogenados (**Figura 8**).

Figura 8. Estrutura química das isohumulonas e seus derivados sintéticos reduzidos¹³.

É sabido que isohumulonas possuem um fragmento α -hidroxi-cetona em sua estrutura, o qual é facilmente quebrado através de um mecanismo de Norrish do Tipo I durante a irradiação para resultar na rota de formação do aroma “lightstruck”, MBT, em cerveja²². Após a inicial absorção de irradiação luminosa, o cromóforo β -carbonílico é excitado ao seu estado singlete, que por sua vez sofre um intercruzamento entre sistemas decaindo ao estado tripleto

metaestável e, sucessivamente, por transferência de energia intramolecular para a carbonila do fragmento α -hidroxi-cetona induz uma fragmentação de Norrish do Tipo I, **Figura 9**.

Figura 9. Proposta de mecanismo para formação de radicais derivados das *trans*-isohumulonas pela sua direta absorção de luz na região de UV²².

Assim, a formação de MBT a partir de diidroisohumulonas não é teoricamente possível, porém, vários outros problemas com relação ao uso de isohumulonas hidrogenadas são encontrados na prática.

Como se pode visualizar na **Figura 10**, isohumulonas reduzidas não são resistentes a decomposição em condições de exposição à luz²³. No entanto, os derivados reduzidos das

isohumulonas são mais propensas a gerar vários aldeídos de baixo peso molecular como o 4-metil-pent-3-enal, também ocasionando um aroma indesejável no produto. Este aroma gerado pela degradação de iso- α -ácidos reduzidos é sensorialmente descrito como similar ao aroma de papelão e lembra o aroma de cerveja não fresca ou estragada.

Figura 10. Mecanismo proposto por Huvaere *et al.*²³ para a decomposição de iso- α -ácidos dihidrogenados em cerveja sob condições de fotooxidação sensibilizada pela riboflavina.

1.6. O Papel dos Compostos Fenólicos Presentes na Cerveja

Visto o importante papel que a riboflavina desempenha na formação do MBT, vários estudos têm focado no desenvolvimento de métodos para reduzir ou eliminar a riboflavina presente na cerveja²⁴. Entretanto, estes métodos não estão ainda maduros para sua aplicação prática. Assim, uma maneira de prevenir esta fotodegradação sensibilizada pela riboflavina é a adição de supressores do estado tripleto excitado da riboflavina^{25, 26}, prevenindo assim a formação do aroma indesejável causado pela exposição do produto à luz.

Um grande número de compostos conhecidamente presentes em cerveja são reportados como supressores do estado tripleto metaestável da riboflavina. Recentes estudos reportam que compostos fenólicos naturalmente presentes em cerveja se apresentam como eficientes supressores do estado tripleto excitado da riboflavina, mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Constante de velocidade específica para a desativação química do estado tripleto excitado da riboflavina e concentração do supressor necessária para desativar 90 % do estado tripleto excitado²⁶

Composto Fenólico	$^3k_q (M^{-1} s^{-1})$	$[Q]^a (M)$
Ácido cafeico	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Ácido 4-coumarico	$1,8 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^{-4}$
Ácido clorogênico	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^{-4}$
Eugenol	$2,2 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Ácido Ferulico	$2,2 \pm 0,1 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Ácido Gálico	$2,0 \pm 0,1 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^{-4}$
Guaiacol	$2,6 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^{-4}$
Ácido 4-Hidroxi-benzóico	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$6,1 \cdot 10^{-4}$
Ácido protocatecuico	$2,4 \pm 0,4 \cdot 10^9$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
Ácido siríngico	$1,6 \pm 0,3 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^{-4}$
Tirosol	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^{-4}$
Ácido vanílico	$2,1 \pm 0,1 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^{-4}$
Vanilina	$2,2 \pm 0,05 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{-4}$

^aConcentração calculada assumindo um tempo de meia vida de 13,4 μ seg para o estado tripleto metaestável da riboflavina

Os dados apresentados na **Tabela 1** demonstram que estes compostos fenólicos presentes em cerveja apresentam constantes de velocidade de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina que atuam competitivamente à constante de velocidade de oxidação da isohumulonas por este estado metaestável. Uma análise mais detalhada dos dados apresentados considerando o teor médio de compostos fenólicos totais presentes na forma livre em cerveja como sendo da ordem de 500 mg/L em conjunto com o teor e a constante de velocidade de desativação química por vários outros supressores conhecidos da riboflavina tripleto excitado também presentes em cerveja, se pode assumir que a interação entre o estado tripleto da riboflavina e as isohumulonas é cineticamente desfavorável em pelo menos 500 vezes.

Além disso, é conhecido que diversos compostos fenólicos (ArOH) que supostamente deveriam agir como antioxidantes captando radicais reativos ($\text{ROO}^\bullet$) (Reação 1) não apresentam a ação esperada²⁷. Isto ocorre, pois em muitas reações o radical fenoxila derivado do composto fenólico não é reativo o suficiente para continuar a deterioração oxidativa. Porém em certas condições, este radical fenoxila formado se apresenta suficientemente reativo frente ao substrato para continuar o processo deteriorativo pela sua surpreendente capacidade de abstrair um átomo de H do substrato em questão, Reação 2.

Além disso, os compostos fenólicos naturalmente presentes na cerveja podem formar esses radicais fenoxilas pela supressão química do estado tripleto excitado das flavinas, como é ilustrada pela **Figura 11**.

Figura 11. Desativação química do estado tripleto excitado de flavinas e formação do radical fenoxila. Mecanismo de fotooxidação do Tipo II.

Para se estudar a reatividade dos iso- α -ácidos (IAAs) frente a esses radicais fenoxila, pode-se utilizar como modelo reacional o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) simulando estes radicais, esse tipo de ensaio é bem estudado para determinar a capacidade e atividade antioxidante de compostos fenólicos e outros e mostrar a afinidade destes compostos por substratos lipídicos²⁸. A estrutura do radical DPPH• é ilustrada na **Figura 12**.

Figura 12. Estrutura do radical DPPH•.

A partir da investigação da reatividade frente ao radical DPPH• é possível determinar a capacidade e a atividade antioxidante dos IAAs. Define-se capacidade antioxidante como a capacidade de captação de radicais, ou seja, está relacionado com a estequiometria de reação dos IAAs com o DPPH•. Já a atividade antioxidante, consiste na cinética do processo, na

velocidade de reação de um suposto antioxidante com radicais. Esses dados fornecem informações importantes sobre o mecanismo de reação dos IAAs frente a radicais.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente projeto de pesquisa podem ser resumidos conforme os tópicos descritos abaixo:

- Determinação do rendimento quântico de fotodegradação de IAAs sensibilizado por flavinas;
- Avaliação do papel de compostos fenólicos naturais na proteção de isohumulonas, frente à fotooxidação;
- Determinação dos produtos de reação entre o estado tripleto excitado da riboflavina e supressores naturais presentes na cerveja, em especial compostos fenólicos, através das técnicas cromatográficas hifenadas a espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS);
- Estudo da reatividade das isohumulonas frente ao radical superóxido;
- Isolar os diastereoisômeros *cis*- e *trans*-isohumulonas e determinar a pureza destes via ^1H -RMN;
- Investigar a reatividade de isohumulonas frente ao radical estável DPPH•, como modelo de radicais fenoxilas formados no processo de desativação química do estado tripleto excitado da riboflavina por compostos fenólicos presentes em cerveja. Determinando a atividade e a capacidade antioxidante de cada diastereoisômeros e da mistura de IAAs;
- Determinar produtos de reação do radical DPPH• e os IAAs, através da técnica de cromatografia líquida de alta performance hifenada a espectrometria de massas de múltiplo estágio (HPLC-ESI-IT-MS/MS).

- Executar cálculos teóricos para determinar a energia total de cada diastereoisômeros, bem como o momento de dipolo destes e a energia dos orbitais HOMO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: riboflavina 5'-monofosfato de sódio (FMN), L-metionina, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ferricitocromo C, xantina, xantina oxidase, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e a β -ciclodextrina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. e utilizados sem prévia purificação. A água deuterada foi obtida Cambridge Isotope Laboratories. O acetato de sódio foi adquirido da Synth. O clorofórmio deuterado foi obtido da Acros Organics. O extrato de lúpulo 30% (w/w) foi gentilmente cedido pela Hopsteiner. Solventes orgânicos e ácidos de grau espectrométrico e HPLC foram adquiridos da Tedia e J. T. Baker. A água utilizada no preparo de soluções (18,2 M Ω cm) foi previamente destilada e deionizada por um sistema Milli-Q (Millipore).

3.1.1. Síntese do Sal de Parker: Actinômetro Químico

O Sal de Parker, $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ (tris(oxalato) ferrato(III) de potássio, tri-hidratado), utilizado no procedimento de actinometria foi sintetizado da seguinte forma^{29, 30}: O procedimento foi todo feito em sala escura sob iluminação de uma lâmpada vermelha. Em um béquer de 500 mL 32 g de cloreto de ferro(III) em 80 mL de água a 60 °C foram misturados com 120 g de oxalato de potássio em 200 mL de água também a 60 °C e deixou-se esfriar sob banho de gelo até a completa cristalização do sal, deixando decantar para a

remoção do sobrenadante e em seguida foi feita uma filtração usando papel de filtro qualitativo Whatman 125.

O sólido obtido foi então dissolvido em água quente, recristalizado em banho de gelo, filtrado á vácuo e lavado com metanol gelado (2x 20 mL), após o procedimento de recristalização, o sólido foi seco em dessecador por 2 horas e posteriormente foi determinada a quantidade de água de cristalização do Sal de Parker por gravimetria²⁹.

3.2. Experimentos de Fotólise

Os experimentos de fotólise, tanto da riboflavina com a L-metionina, na presença e ausência de oxigênio e em solvente deuterado (D₂O), e de uma mistura de iso- α -ácidos (IAAs) com a riboflavina, na presença e na ausência do ácido p-coumárico e do ácido ferúlico em 50% etanol : 50% tampão acetato 20 mmol L⁻¹ a pH aparente 4, foram realizados em uma bancada fotoquímica fabricada pela Oriel empregando-se radiação luminosa contínua, lâmpada de Hg de alta pressão, com comprimento de onda apropriado selecionado por filtros de interferência (440 nm). O cálculo da intensidade de radiação incidente pelo uso de actinômetro químico (K₃[Fe(C₂O₄)₃], tris(oxalato) ferrato(III) de potássio, 0,15 mol L⁻¹), seguindo o procedimento descrito na literatura²⁹.

Os fotoprodutos da degradação da metionina foram separados e identificados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas com analisador de quadrupolo, seguindo o procedimento descrito por Cardoso *et al.*³¹.

Os fotoprodutos da degradação dos iso- α -ácidos (IAAs) foram separados através de cromatografia em fase líquida (HPLC), com uma coluna Zorbax C-18 Extended de 5 μ m e dimensões 2,1x150 mm. Para a separação dos IAAs foram utilizadas as seguintes fases móveis, fase polar (fase A): 20% de etanol e 80% de água em 0,1% de hidróxido de amônio

com pH aparente de 9,95; e fase apolar (fase B): 60% acetonitrila e 40% etanol no respectivo gradiente: 0-3 minutos, 0% da fase B isocrático; 4-3 minutos, 0-16% da fase B; 4-30 minutos, 16-30% da fase B; 30-40 minutos, 30-100% da fase B; 40-45 minutos, 100% da fase B isocrático. Para a separação dos compostos fenólicos foram utilizadas as seguintes fases móveis, fase polar (fase A): água com 0,1% de ácido fórmico; e fase apolar (fase B): metanol com 0,1% de ácido fórmico no respectivo gradiente: 0-14 minutos, 20% da fase B isocrático; 14-60 minutos, 95% da fase B. Para a identificação dos produtos de degradação dos IAAs e dos compostos fenólicos foi acoplado ao cromatógrafo a espectrometria de massas de múltiplo estágio do tipo “ion trap” no modo negativo, para a quantificação foi acoplado ao cromatógrafo um detector de espectrofotometria UV-Vis monitorando o comprimento de onda em 255 nm.

3.3. Geração de Superóxido para o Estudo da Reatividade deste Radical Frente aos IAAs

Foram feitos experimentos da reatividade do radical íon superóxido com os IAAs, seguindo dois procedimentos descritos na literatura^{32,33} com adaptações. O primeiro procedimento para gerar íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) utiliza pulsos de *laser* (440 nm, dois pulsos por segundo) com energia média de 2 mJ por 5 minutos em uma solução 0,5 mmol L⁻¹ de riboflavina em 5% etanol : 95% tampão acetato 20 mmol L⁻¹ (pH aparente 4), com 1,0 mmol L⁻¹ de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e 0,02 mmol L⁻¹ de ferricitocromo C, este serve como sonda para dosar o íon superóxido monitorando a redução do centro metálico por espectrofotometria UV-Vis em 550 nm ($\epsilon = 21000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)³⁴. Assim, variando-se a concentração do analito a ser reagido com o superóxido, pode-se calcular a quantidade de analito que reage com o superóxido produzido. A **Figura 13** ilustra as reações químicas

envolvidas na geração do íon superóxido via fotoquímica, utilizando-se como fotossensibilizador a riboflavina 5'-monofosfato (FMN) e a **Figura 14** ilustra a reação de redução do centro metálico do citocromo C pelo íon superóxido.

Figura 13. Reação de geração de radical superóxido via fotoquímica.

Figura 14. UV-Vis da espécie Citc-Fe(III) e Citc (II) redução do centro metálico do citocromo C pelo íon superóxido.

No caso do segundo procedimento, envolve-se a oxidação da xantina com xantina oxidase, **Figura 15**³⁴, foi feita uma solução 1,2 mM de xantina, previamente diluída no menor volume possível de NaOH 0,1 mmol L⁻¹ e depois ajustado o pH para 8 com HCl 0,01 mol L⁻¹

e aferido o volume. Adicionou-se esta solução a mistura com concentração final de etanol 5% em tampão fosfato pH 7,2, 20 mmol L⁻¹, com força iônica de 0,1 mol L⁻¹, de forma a ficar com concentração igual a 0,1 mmol L⁻¹, com xantina oxidase (0,02 U mL⁻¹), ferricitocromo C (0,02 mmol L⁻¹) e os iso- α -ácidos com concentração de 0,01 - 0,1 mmol L⁻¹, além disso foram tirados espectro de a cada 5 minutos, para poder observar o aumento de formação de Fe (II) em 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $k_1 = 5,8 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)³⁵.

Figura 15. Reação de geração química de superóxido via xantina/xantina oxidase. XO = xantina oxidase.

3.4. Preparo e Isolamento das *trans*-isohumulonas e das *cis*-isohumulonas

Para o preparo e isolamento das *trans*-isohumulonas foi feito o procedimento descrito por Verzele e De Keukeleire¹³, as *trans*-isohumulonas foram preparadas a partir de uma solução aquosa comercial contendo uma mistura de sais de potássio das isohumulonas na forma *trans*- e *cis*-. Esta solução (100 mL; 30 % massa/volume) foi acidificada até pH 1 com solução de ácido clorídrico (1 mol L⁻¹) e então extraída com acetato de etila (200 mL) e a fase orgânica posteriormente seca em MgSO₄. Após seca a fase orgânica, o solvente foi removido por roto-evaporação a pressão reduzida e o resíduo na forma de um óleo (~ 24 g) foi redissolvido com acetato de etila (200 mL) e tratado com diciclohexilamina (50,7 g; 0,28 mol). Os sais de diciclohexilamina das *trans*-isohumulonas seriam então seletivamente precipitados e subsequente coletados. Após recristalização em metanol:água (4:1 v/v; 50 mL) se obteria os sais de diciclohexilamina das *trans*-isohumulonas (~ 10 g) na forma de flocos brancos. Os ácidos livres seriam então obtidos pela dissolução dos sais de diciclohexilamina

em acetato de etila morno (200 mL), acidificação a pH 1 com HCl (1 mol L⁻¹) e separação de fase. A fase orgânica isolada seria seca sob MgSO₄ e então rotoevaporada para obtenção das *trans*-isohumulonas na sua forma ácida livre.

Entretanto, mesmo com o prévio tratamento dos solventes e reagentes orgânicos, não foi obtido sucesso no isolamento das *trans*-isohumulonas, com isso foi utilizado para alguns experimentos a mistura dos sais das isohumulonas (*cis*- e *trans*-) previamente precipitados da mistura comercial 30% (m/V) com ácido clorídrico até pH 1 (C_{H+} = 0,1 mol L⁻¹) e extraído por extração líquido-líquido com acetato de etila (200 mL) e roto-evaporado até a obtenção de líquido amarelo viscoso, este foi armazenado a 4 °C sob vácuo.

Como método alternativo de isolar as *trans*-isohumulonas, foram adaptados os procedimentos descritos por Khatib *et al.*³⁶ para o isolamento das *trans*-isohumulonas com β -ciclodextrina. Para a obtenção das *trans*-isohumulonas utilizou-se a razão molar (IAAs/ β -ciclodextrina) de 4:1, enquanto para os isômeros *cis*-isohumulonas foi utilizada a razão molar (IAAs/-ciclodextrina) de 1:1. O procedimento modificado consiste na dissolução de 3 g de β -ciclodextrina em 24 mL de água (1:8 m/V) aquecida a 70 °C, depois da total dissolução, foi adicionado gota a gota a mistura comercial de IAAs (3,2 g) e a solução resultante mantida a temperatura de 70 °C por 30 minutos. Após este procedimento a mistura foi deixada em repouso a 4 °C por 48 h para ocorrer a precipitação do complexo β -ciclodextrina-*trans*-isohumulonas.

Em vista de se obter as *trans*-isohumulonas, centrifugou-se o precipitado supracitado a 7000 rpm e 5 °C por 30 minutos e coletou-se o sobrenadante, em seguida o precipitado foi lavado com água a 5 °C e a centrifugação repetida e novamente retirou-se o sobrenadante. Este procedimento de lavagem foi repetido pelo menos duas vezes. O sólido resultante foi liofilizado e armazenado na geladeira a 4 °C em frasco âmbar para posterior análise.

A liberação das *trans*-isohumulonas do complexo com β -ciclodextrina (100 mg) foi feita com 50 mL de metanol sob agitação por 30 minutos, em seguida a solução de metanol foi filtrada e rotaevaporada até a secura. O resíduo restante de β -ciclodextrina foi eliminado dissolvendo a amostra em 25 mL de acetato de etila, seguida de filtração e rotaevaporação até a secura, obtendo-se dessa forma as *trans*-isohumulonas na forma deprotonada, com pureza de 95%, determinado via HPLC.

Para se obter as *cis*-isohumulonas, o sobrenadante obtido após a precipitação foi filtrado e liofilizado. O sólido resultante da liofilização foi então dissolvido em 50 mL de acetato de etila, filtrado e rotaevaporado até a secura, obtendo-se as *cis*-isohumulonas deprotonadas na forma de um óleo na parede do balão, pureza de 95%, determinada via ^1H RMN.

Os isômeros *trans*- foram armazenados na forma do complexo com β -ciclodextrina seco e em atmosfera inerte na geladeira (4 °C) e no abrigo da luz, sendo liberados do complexo antes do uso. Os isômeros *cis*- foram sempre preparados no período anterior aos experimentos e análises.

3.5. Caracterização dos iso- α -ácidos isolados

Para realizar as análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, após a última rotaevaporação até a secura, as amostras foram dissolvidas em etanol com 1% de ácido fórmico e novamente rotaevaporado até a secura e o resíduo redissolvido em clorofórmio deuterado. Este procedimento foi realizado em vista de garantir que os iso- α -ácidos se encontrassem na forma protonada.

A análise por RMN- ^1H dos isômeros *trans*- foi realizado em um espectrômetro ARX 200 - 4,7 Tesla (Bruker), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência e clorofórmio

deuterado como solvente. A análise por RMN- ^1H dos isômeros *cis*- foi realizado em um espectrômetro AC 200 - 4,7 Tesla (Bruker).

A concentração analítica dos IAAs foi determinada via UV-Vis pelo pico de absorção em 279 nm ($\epsilon=11500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em um espectrofotômetro Cary 5G (Varian) em meio etanol acidificado com 1% de ácido fórmico.

A separação cromatográfica líquida para a caracterização das *trans*-isohumulonas foi efetuada em uma coluna Zorbax C-18-Extended recheada com partículas de 5 μm e dimensões 2,1x150 mm. Foram utilizadas as seguintes fases móveis, Fase móvel: Fase A – acetato de amônio (5mM)/H₂O/Etanol (20% v/v); Fase B – acetonitrila/Etanol (40% v/v); Gradiente: 0-3 min: 0% B isocrático, 3-4 min: 0-16% B, 4-54 min: 16-30% B, 54-57 min: 30-95% B, 57-65 min: 95% B isocrático. O sistema cromatográfico compostos por duas bombas Shimadzu modelo LC20AT e injetor Rheodyne modelo 8125 com “loop” de 5 μL foi hifenado a um espectrômetro de massas Bruker modelo Esquire 4000 de múltiplo estágio do tipo “ion trap” operando no modo de detecção negativo e utilizando interface de ionização por electrospray (ESI).

3.6. Capacidade e Atividade Antioxidante

A capacidade e atividade antioxidante dos iso- α -ácidos foi determinada frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $\bullet$), em soluções de etanol-água (1:1 V/V) com $C_{\text{H}^+} = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica de $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl) e em soluções de etanol e etanol acidificado com 1% de ácido fórmico.

Os valores de capacidade antioxidante foram obtidos pela reação de redução de uma solução $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do radical DPPH $\bullet$ com $6,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de iso- α -ácidos. A reação foi acompanhada espectrofotometricamente e o consumo do radical DPPH $\bullet$ determinado pela sua

banda de absorção centrada em 520 nm ($\epsilon = 12500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{37, 38}. O valor de capacidade antioxidante foi então determinado pela equação:

$$\text{Capacidade} = \frac{C_{IAA \text{ consumido}}}{C_{DPPH\bullet \text{ consumido}}}$$

As concentrações utilizadas nessa equação foram obtidas pela Lei de Lambert-Beer, no caso DPPH• a concentração foi determinada pela diferença de absorbância em 520 nm entre o início e o fim da reação.

A atividade antioxidante foi avaliada através da reatividade dos iso- α -ácidos frente ao radical DPPH• (cinética da reação). Para tanto a cinética de redução do radical DPPH• foi acompanhada espectrofotometricamente, monitorando-se a banda de absorção do radical em 520 nm ($\epsilon = 12500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em função do tempo.

Os experimentos de cinética foram realizados com as *trans*-isohumulonas em etanol e em etanol acidificado com 1% de ácido fórmico para garantir que as *trans*-isohumulonas estarão majoritariamente na sua forma molecular. A **Figura 16** ilustra o equilíbrio ácido-base dos iso- α -ácidos ($\text{pK}_a \approx 3$)¹⁷.

Figura 16. Equilíbrio ácido-base dos iso- α -ácidos.

Os experimentos cinéticos foram realizados em condições de pseudo-primeira ordem, nas temperaturas de 15, 25, 35 e 40 °C, com as seguintes condições iniciais:

- a) IAAs: A concentração inicial do radical DPPH• foi de $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se a concentração inicial da mistura de IAAs (1,33; 1,67; 2,00 e 2,67). $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- b) *trans*-isohumulonas: A concentração inicial do radical DPPH• foi de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se a concentração inicial do diastereoisômeros *trans*- (0,67; 0,83; 1,00 e 1,33). $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- c) *cis*-isohumulonas: A concentração inicial do radical DPPH• foi de $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se a concentração inicial do diastereoisômeros *cis*- (0,43; 0,54; 0,65 e 0,86). $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em um espectrofotômetro Cary 5G (Varian) utilizando-se de uma cela de quartzo de 10 mm QS Hellma e a temperatura de reação controlada pelo controlador de temperatura do próprio espectrofotômetro e aferido na cela por um termômetro externo, com exatidão de 0,05°C.

3.7. Identificação dos produtos de reação das *trans*-isohumulonas com o radical DPPH•

Os produtos de reação das *trans*-isohumulonas com o radical DPPH• foram submetidos à separação por cromatografia líquida e detecção por espectrometria de massas. A separação cromatográfica líquida foi efetuada em uma coluna Zorbax C-18-Extended recheada com partículas de 5 µm e de dimensões 2,1x150 mm. Foram utilizadas as seguintes fases móveis, fase polar (fase A): água em 0,1% de ácido fórmico; e fase apolar (fase B): acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico com gradiente de eluição: 0-5 minutos, 0-30% da fase; 5-20 minutos, 30-50% da fase B; 20-35 minutos, 50-65% da fase B; 35-55 minutos, 65-100% da fase B. . O sistema cromatográfico compostos por duas bombas Shimadzu modelo

LC20AT e injetor Rheodyne modelo 8125 com “loop” de 5uL foi hifenado a um espectrômetro de massas Bruker modelo Esquire 4000 de múltiplo estágio do tipo “ion trap” operando no modo de detecção negativo e utilizando interface de ionização por electrospray (ESI).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fotodegradação de IAAs na Presença de Flavinas

Em junção ao insucesso de obter a trans-isohumulona a partir do método descrito por Verzele e De Keukeleire¹³ na seção experimental, possivelmente devido à baixa relação *trans*-/*cis*- e a presença de produtos de oxidação no extrato que poderiam estar inibindo a cristalização, decidiu-se realizar os experimentos com a mistura de iso- α -ácidos previamente precipitados com HCl (1 mol L⁻¹) e extraídos com acetato de etila e rotaevaporado. A **Tabela 2** reporta a composição química em termos de IAAs obtidos por HPLC-UV-vis.

Tabela 2. Composição da mistura de IAAs, calculada através de análise cromatográfica

Composição da Mistura de Iso- α -ácidos		
<i>cis</i> -co-isohumulonas	<i>trans</i> -co-isohumulona	<i>n</i> -/ <i>ad</i> -isohumulonas (<i>cis</i> - e <i>trans</i> -)
25,3%	6,8%	67,9%

Primeiramente, efetuamos o estudo do rendimento quântico e quantificação da degradação dos IAAs, na presença e ausência de compostos fenólicos majoritários na cerveja, como o ácido ferúlico e o ácido p-coumárico e na presença e ausência de oxigênio, estas reações foram todas sensibilizadas por riboflavina 5'-monofosfato de sódio (FMN), também presente na composição da cerveja³⁹, seguindo o método descrito por Vanhoenacker *et al.*⁴⁰ com algumas adaptações. Constatou-se que os iso- α -ácidos são protegidos contra fotoxidação sensibilizada pela riboflavina no estado tripleto excitado na presença de oxigênio e na presença do ácido p-coumárico como pode-se observar na **Tabela 3**.

Tabela 3. Resultados da degradação dos IAAs fotossensibilizada por riboflavina

Amostra	Condições*	Concentração total de iso- α -ácidos ($\mu\text{mol/L}$)	Porcentagem de degradação (%)	Rendimento quântico de consumo dos IAAs (mol/einstein)	Velocidade relativa ($v_{\text{IAAs}}/v_{\text{supressor}}$)
A1	não irradiada, sem ác. p-coumárico	31,3	-	ND**	ND**
A2	irradiada com O ₂ , sem ác. p-coumárico	20,4	34,8	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-2}$
A3	irradiada sem O ₂ , sem ác. p-coumárico	9,2	70,6	$(9,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	ND**
B1	não irradiada, com ác. p-coumárico ^a	30,0	-	ND**	ND**
B2	irradiada com O ₂ , com ác. p-coumárico ^a	24,5	15,2	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$
B3	irradiada sem O ₂ , com ác. p-coumárico ^a	20,5	31,6	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$9,4 \times 10^{-3}$
C1	<i>trans</i> -isohumulonas, não irradiada	21,6	-	ND**	ND**
C2	<i>trans</i> -isohumulonas, irradiada com O ₂	17,8	15,1	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	ND**

*[FMN] = 0,1 mmol L⁻¹; [IAA] = 0,03 mmol L⁻¹; irradiado por 20 minutos; ^a[p-coumárico] = 0,3 mmol L⁻¹; **ND = Não determinado. As constantes de velocidade de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina pelo oxigênio: $k_{\text{O}_2} = 9,8 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$; pelo ácido p-coumárico: $k_{\text{ácido p-coumárico}} = 1,8 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$; pelos IAAs: $k_{\text{IAAs}} = 1,7 \times 10^8$;

Pela **Tabela 3** verificou-se um rendimento quântico do consumo dos IAAs baixo ($\Phi = 4,8 \times 10^{-3}$) indicando que para cada mol de fóton absorvido apenas ~0,5% é utilizado no consumo dos IAAs.

Nas amostras codificadas como A2, presença de oxigênio e ausência de ácido p-coumárico, e B3, ausência de oxigênio e presença de ácido p-coumárico, observa-se uma porcentagem de degradação dos IAAs muito próxima, isso ocorre devido às constantes de velocidade de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina pelo oxigênio e pelo ácido p-coumárico serem muito próximas, $k_{\text{O}_2} = 9,8 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{ácido p-coumárico}} = 1,8 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente^{26, 41}, logicamente as concentrações de oxigênio e de ácido p-coumárico precisam ser próximas para que isto ocorra, como nas condições experimentais a

concentração de oxigênio estimada é de uma solução saturada com ar a 25 °C ($[O_2] = 0,25 \text{ mmol L}^{-1}$)⁴² e a concentração usada de ácido p-coumárico ($[\text{ácido p-coumárico}] = 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$) são semelhantes isto se torna possível. Desta forma, há um efeito aditivo de proteção na amostra B2, presença de oxigênio e de ácido p-coumárico.

Assim é possível averiguar que a presença de oxigênio e de compostos fenólicos protege os IAAs, por “retardo” de reação. Porém, mesmo na presença de altos teores de compostos fenólicos, observa-se a degradação o que sugere a participação de radicais gerados pela desativação química (Tipo I) das flavinas pelos precursores fenólicos.

Não foi possível comparar a porcentagem de degradação das *trans*-isohumulonas com os demais experimentos, pois houve diferença significativa na intensidade da lâmpada nos diferentes dias de execução. Com relação aos experimentos com a mistura de IAA, os mesmos foram realizados todos em dias consecutivos, nos quais não houve muita diferença na intensidade da lâmpada, permitindo assim esta comparação. Entretanto, é possível fazer a comparação do rendimento quântico do consumo dos IAAs, o qual considera a intensidade da lâmpada (reportado em einstein/min) em seu cálculo. Desta forma, podemos observar que não há diferença significativa ($p = 0.05$) no rendimento quântico de fotodegradação dos diferentes diastereoisômeros sensibilizada por flavinas, amostras A2 e C2 (**Tabela 3**), sugerindo que o sítio de reação, sistema beta tricarbonílico, não sofre influência estereoquímica como o observado na reação entre os IAAs e o radical DPPH[•].

A identificação dos IAAs foi feito por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas, assim foi possível identificar a *co*-isohumulona ($[M-H]^- = 347$) e a *n*- e *ad*-isohumulona ($[M-H]^- = 361$)⁴⁰ que coeluíram, como mostrado no cromatograma da **Figura 17**.

Figura 17. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1 = cis-co-isohumulona e trans-co-isohumulona; Picos 2 = n-/ad-isohumulonas; (b) Espectro de massas dos Picos 1; (c) Espectro de massas dos Picos 2.

Na presença de oxigênio, observa-se uma menor degradação dos IAAs, tanto na presença do ácido p-coumárico, quanto na ausência deste, porém podemos observar pela **Tabela 3**, que há uma maior proteção dos IAAs na presença do composto fenólico, em comparação com as amostra em que este está ausente.

Além disso, mudando as condições cromatográficas, como fase móvel, foi feito a separação e identificação dos produtos de degradação na presença dos compostos fenólicos, ácido p-coumárico (**Figura 18**) e ácido ferúlico (**Figura 19**), como mostrado nos cromatogramas das **Figuras 20 e 21** abaixo:

Figura 18. Estrutura do ácido p-coumárico, $[M-H]^- = 163$ m/z.

Figura 19. Estrutura do ácido ferúlico, $[M-H]^- = 193$ m/z.

Figura 20. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1, 2, 3, 4 e 5 = produtos de degradação do IAAs na presença de ácido p-coumárico e oxigênio; (b), (c), (d), (e) e (f) Espectros de massas dos picos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente e as possíveis estruturas dos íons indicados.

Figura 21. (a) Cromatograma de íon total: Picos 1 e 2 produtos de degradação do IAAs na presença de ácido ferúlico e oxigênio; (a) e (b) Espectros de massas dos picos indicados no cromatograma e possíveis estruturas dos íons indicados nos espectros.

Através da leitura dos dados contidos na **Figura 20** é possível identificar dímeros e trímeros do ácido p-coumárico e alguns derivados destes oriundos da fragmentação no detector como é proposto na **Figura 22**, a qual mostra os dois picos mais intensos do espectro **Figura 20** (b), sendo novamente isolados e fragmentados. Analogamente, nas **Figuras de 23 a 26** são mostrados os picos mais intensos dos espectros da **Figura 20** (c) a (f) sendo isolados e fragmentados novamente, respectivamente.

Na **Figura 21**, é possível identificar dímeros do ácido ferúlico, com derivados parcialmente descarboxilados. Para melhor investigar a estrutura destes íons formados e da

fragmentação destes serão feitos estudos mais aprofundados com espectrometria de massas de múltiplo estágio.

Figura 22. MS² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) [M-H]⁻ = 325 e (c) [M-H]⁻ = 237, em (d) um esquema de fragmentação do dímero formado durante a fotodegradação.

Figura 23. MS² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) $[M-H]^- = 281$ e (c) $[M-H]^- = 211$, em (d) um esquema proposto de fragmentação do fotoproduto.

Figura 24. MS² dos dois picos mais intensos em (a), mostrados em (b) $[M-H]^- = 443$ e (c) $[M-H]^- = 281$, em (d) um esquema proposto de fragmentação do foto-produto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido à disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.

Figura 25. MS² do segundo pico mais intenso em (a), mostrado em (b) $[M-H]^- = 487$, em (c) um esquema proposto de fragmentação do foto-produto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido a disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.

Figura 26. MS² do segundo pico mais intenso em (a), mostrado em (b) $[M-H]^- = 399$, em (c) um esquema proposto de fragmentação do fotoproduto, neste caso há mais de uma opção de fragmentação devido a disponibilidade de mais de uma carboxila presente na estrutura.

Na **Figura 23**, não é observado os mesmos fragmentos para os íons de massa $[M-H]^- = 281$ e $[M-H]^- = 211$, indicando que pode ter ocorrido a coeluição de compostos diferentes durante o pico indicado no cromatograma da **Figura 20**.

A proposta de mecanismo de reação de formação dos dímeros é mostrada na **Figura 27** de maneira análoga deve ocorrer com o ácido ferúlico.

Figura 27. Dimerização proposta do ácido p-coumárico em orto- ao grupo fenol.

Esses oligômeros formados também devem possuir capacidade antioxidante, devido à presença das hidroxilas fenólicas e com isso devem proteger os IAAs, porém não ocorre uma proteção total, isso reforça a idéia que haja a formação de subprodutos reativos que possam degradar os IAAs.

Além do que já foi constatado nos dados da **Tabela 3**, sobre a maior proteção dos IAAs na presença de oxigênio, há maior degradação dos compostos fenólicos, como mostrados nos cromatogramas das **Figuras 28 e 29**:

Figura 28. Banda de Eluição do ácido p-coumárico nas amostras: (Boi) Amostra com oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Bn) Amostra não irradiada; (Bsi) Amostra sem oxigênio, irradiada por 30 minutos.

Figura 29. Banda de eluição do ácido ferúlico nas amostras: (Csi) Amostra sem oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Coi) Amostra com oxigênio, irradiada por 30 minutos; (Cn) Amostra não irradiada.

Em caráter semi-quantitativo, é possível observar uma maior degradação dos ácidos fenólicos na presença de oxigênio, **Figura 29**, uma vez que a banda de eluição na amostra não irradiada (Cn) possui menor altura, porém é mais larga que as demais, e ainda possuem uma

área maior (223 unidades de área), enquanto as amostras Csi e Coi possuem 218 e 204 unidades de área.

Não é possível a comparação dos dados obtidos nesta sessão com dados da literatura, pois este foi um experimento pioneiro com os isômeros isolados.

4.2. Reatividade dos IAAs Frente ao Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Dada a estrutura dos IAAs nas **Figuras 2 e 16**, o potencial redox destes na forma mono aniônica ($E^\circ = 1,4V$ vs. NHE)⁴³ e o potencial redox do radical íon superóxido ($E^\circ = -0,16V$ vs. NHE)⁴⁴, é de se esperar que houvesse adição nucleofílica do radical superóxido nos átomos de carbonos alílicos menos substituídos dos grupos prenilas presentes nos IAAs. Entretanto, essa reação não foi observada para nenhuma das condições experimentais das metodologias empregadas, descritas na sessão experimental, como é mostrado **Figura 30 e 31**, mesmo aumentando a concentração de IAAs ao limite de solubilidade em 5% de etanol em tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ a pH aparente 7,2, neste pH é descartada a possibilidade do radical superóxido reagir com íon H^+ e formar o radical hidroperoxil^{45, 46}:

Além disso, para medir a reação dos IAAs com o radical superóxido a banda característica de Ferrocitocromo-C em 550 nm iria diminuir, pois haveria competição pelo radical superóxido, mas isso não foi observado nas concentrações utilizadas de IAAs (0,1 mmol L⁻¹).

Figura 30. Espectro da reação do radical íon superóxido com IAAs, feito pelo método de pulso de laser, fotossensibilizado por $[FMN] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, com $[DTPA] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[Ferricitocromo-C] = 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 31. Espectro da reação do radical íon superóxido feita com xantina/xantina oxidase. $[XO] = 0,02 \text{ U mL}^{-1}$; $[xantina] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; $[Ferricitocromo-C] = 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3. Isolamento e Caracterização das *trans*-isohumulonas e das *cis*-isohumulonas

A mistura de IAAs foi submetida ao procedimento descrito por Khatib *et al.*³⁶ com adaptações para isolar os isômeros *trans*-isohumulonas e *cis*-isohumulonas através da complexação seletiva dos isômeros *trans*-isohumulonas com β -ciclodextrina. A **Figura 32**

ilustra esquematicamente o processo de separação, que ocorre via precipitação estereoseletiva dos diastereoisômeros *trans*- com a β -ciclodextrina. Os isômeros separados e isolados de acordo com o procedimento experimental foram submetidos à análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN), espectroscopia eletrônica e LC-ESI-MS(n).

Figura 32. Ilustração esquemática da separação dos diastereoisômeros por complexação seletiva com β -ciclodextrina.

A partir dos dados gravimétricos e de espectroscopia eletrônica foram estimados os seguintes rendimentos referentes ao processo de separação e isolamento: são 6% e 15% para *cis*- e *trans*-, respectivamente. Os cálculos de rendimento foram efetuados com base à massa inicial da mistura de IAAs, cujo teor inicial de iso- α -ácidos totais é de 30% (m/m). A **Figura 33** ilustra os espectros eletrônicos obtidos para as isohumulonas em meio de etanol com uma solução de NaOH 2 mol L⁻¹ (10:1 V/V) (**Figura 33a**) e em etanol com uma solução de HCl 2 mol L⁻¹ (10:1 V/V) (**Figura 33b**).

Os espectros de absorção na região do UV-Vis das isohumulonas variam de acordo com o meio, em etanol alcalino (**Figura 33a**) há uma banda em 251 nm ($\epsilon = 18300 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹³ e um ombro na região de 270 nm ($\epsilon = 14900 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), enquanto que em etanol ácido (**Figura 33b**) há a formação de dois picos bem resolvidos com máximos de absorção em 225 nm ($\epsilon = 10200 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 271 nm ($\epsilon = 11500 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Figura 33. Espectro eletrônico de absorção UV-Vis das isohumulonas. (a) etanol:NaOH 2 mol L⁻¹ (10:1 V/V); (b) etanol:HCl 2 mol L⁻¹ (10:1 V/V).

A pureza dos diastereoisômeros *trans*- e *cis*- isolados foi estimada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas. As **Figuras 34 e 35** ilustram os respectivos espectros de ¹H RMN.

Figura 34. Espectro de ¹H RMN dos *trans*-iso- α -ácidos isolados.

Figura 35. Espectro de ¹H RMN dos *cis*-iso- α -ácidos isolados. O asterisco indica impurezas na amostra.

Observa-se através da leitura dos espectros de ^1H RMN que a separação dos diastereoisômeros foi bem sucedida quando comparado aos dados da literatura¹³, sendo que as *trans*-isohumulonas foram caracterizadas principalmente pelos picos:

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS): δ : 2,15 (1H, m); 2,40 (2H, m); 2,70 (2H, d, $J = 7\text{Hz}$); 3,27 (2H, d, $J = 7\text{Hz}$); 5,00 (1H, t, $J = 7\text{Hz}$); 5,17 (1H, t, $J = 7\text{Hz}$).

Sendo que o pico com deslocamento químico de 2,70 ppm é característicos das *trans*-isohumulonas.

Porém na separação e isolamento das *cis*-isohumulonas podemos observar a presença de algumas impurezas, veja **Figura 35**, os quais são possivelmente produtos de oxidação do extrato inicial de IAAs. Ainda assim os picos referentes às *cis*-isohumulonas possuem uma área muito superior as dos interferentes, portanto aos realizar os experimentos de cinética com estes isômeros, não foi realizada posterior purificação (pureza 99%). A espécie *cis*-isohumulona foi caracterizada pela presença dos seguintes picos:

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS): δ : 2,43 (2H, m); 2,73 (2H, d); 3,30 (2H, d, $J = 6,5\text{Hz}$); 5,01 (1H, t, $J = 6,5\text{Hz}$); 5,19 (1H, t, $J = 6,5\text{Hz}$).

Os picos referentes a impurezas no espectro de ^1H RMN da espécie *cis*-isohumulonas são observados nos seguintes deslocamentos químicos: δ : 4,08 (d); 6,14-6,64 (m); 7,07 (m); 7,62 (m).

A **Figura 36** ilustra o cromatograma da amostra de *trans*-isohumulonas (10 mg L^{-1}) obtido pelo procedimento descrito (em azul), comparado a mistura comercial de IAAs (em vermelho). O pico 1 da **Figura 36** indica a *cis*-co-isohumulona; o pico 2 a *trans*-co-isohumulona; o pico 3 a *cis*-n-isohumulona e a *cis*-ad-isohumulona que coeluíram e o pico 4 a *trans*-n-isohumulona e a *trans*-ad-isohumulona.

Figura 36. Cromatograma de íon total das *trans*-isohumulonas (em azul) e da solução comercial de IAAs (em vermelho). Pico 1: *cis*-co-isohumulona; pico 2: *trans*-co-isohumulona; pico 3: *cis*-n-isohumulona e *cis*-ad-isohumulona; pico 4: *trans*-n-isohumulona e *trans*-ad-isohumulona.

4.4. Capacidade e Atividade Antioxidante dos IAAs Frente ao Radical Estável

DPPH•

Como descrito anteriormente na introdução, a capacidade antioxidante pode ser definida como a capacidade de captação de radicais, ou seja, está relacionado com a estequiometria de reação dos IAAs com o DPPH•. Já a atividade antioxidante, consiste na cinética do processo, na velocidade de reação de um suposto antioxidante com radicais.

Como pode ser observada pelo espectro eletrônico, **Figura 33**, os diastereoisômeros *trans*- e *cis*- isohumulonas não apresentam absorção na região do visível e assim não interferem com o monitoramento do radical DPPH•, o qual apresenta banda de absorção na região do amarelo ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$; $\epsilon = 12500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A capacidade antioxidante foi avaliada pela titulação espectrofotométrica do radical DPPH• com iso- α -ácidos, mostrada na **Figura 37**, na qual pode-se observar o consumo do radical DPPH• pela diminuição do pico na região de 520nm. A estequiometria de reação foi

então calculada adicionando-se excesso de DPPH• em relação à concentração molar dos IAAs. Com os resultados obtidos da reação, procedem aos seguintes cálculos:

$$Abs_{inicial} = 0,35818$$

$$Abs_{final} = 0,31832$$

$$Abs_{inicial} - Abs_{final} = Abs_{DPPH\bullet consumido} = 0,03986$$

$$Abs = \epsilon cd$$

$$c_{DPPH\bullet consumido} = \frac{Abs_{DPPH\bullet consumido}}{\epsilon d} = \frac{0,03986}{1,25 \times 10^4 \times 1} = 3,19 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\frac{c_{IAA consumido}}{c_{DPPH\bullet consumido}} = \frac{1,54 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}}{3,19 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} = \frac{1}{2}$$

onde, Abs é a absorvância medida, ϵ é o coeficiente de extinção molar do DPPH•, $1,25 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d é o caminho ótico da cela, 1 cm, e c é a concentração analítica de DPPH•. Como a concentração analítica inicial de IAA na reação foi de $1,54 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, obtemos uma estequiometria de reação 1:2 dos iso- α -ácidos com o DPPH•. Esta estequiometria de reação está intrinsecamente ligada a capacidade de abstração dos dois átomos de hidrogênio alílicos, grupos prenilas, dos IAAs.

Figura 37. Curva de cinética espectrofotométrica, ilustrando a supressão do pico na região de 520 nm, referente ao radical DPPH•. Com concentrações iniciais de $[trans\text{-isohumulonas}] = 0,78 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[DPPH\bullet] = 0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ em etanol:1% de ácido fórmico.

A partir do monitoramento do decaimento do radical DPPH• ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$), o qual aumenta linearmente com a concentração de IAAs, é possível calcular a constante de velocidade observada da reação, k_{Obs} , pelo ajuste não-linear das curvas ilustradas na **Figura 38** pela equação:

$$y = A \cdot e^{(-k_{\text{Obs}} \cdot x)} + C$$

Onde, C é uma constante referente ao valor de absorbância residual no infinito, A é o fator pré-exponencial, y é a absorbância em 520 nm no tempo x e x é o tempo em segundos.

Através dos valores da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem, k_{Obs} , em função da concentração de IAAs, podemos obter a constante de velocidade específica, k_2 , através da relação linear:

$$k_{\text{Obs}} = k_2[IAA]$$

A **Figura 39** ilustra o gráfico linear de k_{Obs} vs. concentração de IAAs. O intercepto linear diferente de zero corresponde ao decaimento natural do radical DPPH• nas condições experimentais empregadas, neste caso, o decaimento está na faixa do erro experimental, ou seja, o radical é estável e não decai espontaneamente nas presentes condições experimentais.

A constante de velocidade bimolecular a 25 °C (298 K), k_2 , calculada a partir das **Figuras 39 e 40**, é de $2,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em etanol acidificado com 1% de ácido fórmico. Comparando-se esse dado com dados da literatura⁴⁷, é possível verificar que a constante de velocidade de reação dos IAAs possui valor próximo com as constantes de velocidade de alguns fenóis simples. As constantes de velocidades para a redução do radical DPPH• por fenóis simples variam de 3 ordens de grandeza a mais a poucas unidades a menos. Por exemplo, a constante de velocidade de reação com DPPH• do 2,6-dimetil-4-ciano-1-fenol em etanol é de $6,1 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ frente a $2,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ da mistura de IAAs em meio ácido, enquanto a constante de velocidade de reação com DPPH• do 4-metóxi-1-fenol é $14 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Figura 38. Cinética de reação a 25 °C (298 K) fixando a concentração de DPPH ($3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e variando a concentração dos IAAs ($(0,66; 0,82; 0,98; 1,15; 1,31) \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol com 1% de ácido fórmico.

Figura 39. Gráfico de k_{obs} vs. concentração de IAA ((1,00; 1,25; 1,51; 1,76; 2,01). 10^{-3} mol L⁻¹) em etanol com 1% de ácido fórmico a temperatura de $25 \pm 0,2$ °C.

A partir da dependência da constante de velocidade pela temperatura pode-se obter a entalpia de ativação, $\Delta H^\ddagger$, e a entropia de ativação, $\Delta S^\ddagger$, da reação a partir do gráfico de Eyring (**Figura 40**).

Figura 40. Gráfico de Eyring. Cada ponto no gráfico corresponde à análise em triplicata.

Com a equação do ajuste linear aos pontos da **Figura 40**, tem-se os seguintes cálculos a partir da equação de Eyring⁴⁸:

$$\begin{aligned}y &= -mx + b \\x &= 1/T \\y &= \ln(k/T) \\m &= -\Delta H^\ddagger / R \\b &= y(x=0) = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \\\Delta G^\ddagger &= \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger\end{aligned}$$

onde, k é a constante de velocidade observada em determinada temperatura, k_B a constante de Boltzmann, h a constante de Planck e R é a constante universal dos gases⁴⁹. Assim, calculando os valores de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$, no exemplo os dados são referentes à mistura de IAAs em etanol a 1% de ácido fórmico:

$$\begin{aligned}\Delta H^\ddagger &= -m \cdot R = 3012,7 K \cdot 8,3145 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1} = 25,0 kJ \cdot mol^{-1} \\\Delta S^\ddagger &= (y(x=0) - \ln \frac{k_B}{h}) \cdot R = (5,08 - 23,76) \cdot 8,3145 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1} = -155 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}\end{aligned}$$

Com os valores de $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ é possível calcular a variação da energia livre de Gibbs a 25 °C (298 K), $\Delta G^\ddagger$, pela equação:

$$\begin{aligned}\Delta G^\ddagger &= \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger \\\Delta G^\ddagger &= 71,2 kJ \cdot mol^{-1}\end{aligned}$$

Pela **Tabela 4** é possível verificar que não há diferença significativa das constantes de velocidade específica entre a mistura de IAAs e os isômeros isolados das *trans*-isohumulonas. No entanto, para os isômeros isolados das *cis*-isohumulonas há diferença significativa entre as

constantes de velocidade específica e a mistura de IAAs. Esta diferença é em torno de uma ordem de grandeza a menos para as *cis*-isohumulonas, isso prova que frente à reação com DPPH• as *cis*-isohumulonas possuem menor atividade antioxidante quando comparado com as *trans*-isohumulonas.

Tabela 4. Constantes de velocidade específica de reação das isohumulonas com o radical DPPH•, em diferentes temperaturas e os respectivos parâmetros de ativação da reação

Temperatura (°C)	k_2 (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Amostra	$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\ddagger$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)
15	1,5 ± 0,1	Mistura de IAAs em Etanol	35 ± 4	-120 ± 10	69,4
25	3,0 ± 0,2				70,6
35	4,1 ± 0,1				71,8
40	5,5 ± 0,9				72,4
15	1,3 ± 0,1	Mistura de IAAs em 1% de ácido fórmico em etanol	25 ± 2	-155 ± 6	69,6
25	2,0 ± 0,2				71,2
35	2,9 ± 0,1				72,7
40	3,2 ± 0,4				73,5
15	0,8 ± 0,1	Somente <i>trans</i> em 1% de ácido fórmico em etanol	44 ± 9	-93 ± 9	71,0
25	1,3 ± 0,1				71,9
35	2,7 ± 0,4				72,8
40	3,7 ± 0,1				73,3
15	0,14 ± 0,02	Somente <i>cis</i> em 1% de ácido fórmico em etanol	63 ± 3	-41 ± 8	75,0
25	0,41 ± 0,01				75,4
35	0,88 ± 0,04				75,8
40	1,27 ± 0,03				76,0

Porém, se comparados aos fenóis simples citados anteriormente, o diastereoisômero *cis*- ainda se encontram em uma faixa intermediária de velocidade de reação, podendo haver competição entre fenóis simples e estes.

A diferença de reatividade dos diastereoisômeros (*cis*- e *trans*-) frente ao radical DPPH• aparentemente está conectada ao arranjo estereoquímico dos grupos laterais isohexenoil e prenil conectados aos carbonos C(4) e C(5), respectivamente.

A **Figura 41** mostra a configuração espacial mais estável obtida para as moléculas de *cis*- e *trans*- isohumulona através de cálculos de dinâmica molecular por DFT com o método

B3LYP, base 6-311+G(d,p), otimizado em um contínuo dielétrico simulando o etanol (IEFPCM). A conformação resultante da espécie *cis*- apresenta energia total de -1076,79522673 u.a. contra -1076,78919944 u.a. do diastereoisômero *trans*-, sendo a primeira mais estável termodinamicamente, conforme esperado. O dipolo elétrico de ambos diastereoisômeros também foi calculado por DFT resultando nos valores de 2,2627 D e 5,7496 D para a *cis*-isohumulona e *trans*-isohumulona, respectivamente, sugerindo uma maior influência do solvente na reatividade da espécie *trans*-.

Figura 41. Arranjo espacial da estrutura de menor energia da molécula (A) *cis*-isohumulona e (B) *trans*-isohumulona obtido após cálculos de dinâmica molecular.

Dados teóricos com relação aos orbitais de fronteira foram também obtidos, ainda que preliminares, e indicam a mesma energia do orbital HOMO ($E_{\text{HOMO}} = -0,236$ u.a.) para ambos diastereoisômeros, sugerindo a não dependência estereoquímica do potencial de oxidação conforme verificado experimentalmente por métodos eletroquímicos. A **Figura 42** ilustra o gráfico de contorno para o orbital molecular virtual ocupado de mais alta energia (HOMO) para as estruturas otimizadas da *cis*- e *trans*- isohumulona. Conforme leitura da **Figura 42**, sugere-se a contribuição dos mesmos átomos para o orbital HOMO dos dois diastereoisômeros sendo estes localizados principalmente no grupo prenil conectado ao carbono C5 em desacordo ao proposto por Huvaere *et al.*¹³ que sugere o grupo hexenoil

conectado ao carbono C4 como sítio primário de oxidação das isohumulonas quando na forma molecular. Com base nos dados teóricos e experimentais aqui reportados, podemos inferir que a proximidade dos sítios de insaturação, hidrogênios alílicos, no diastereoisômero *trans*-proporciona uma maior densidade de elétrons e proximidade dos sítios de reação favorecendo a oxidação via radicalóide desta espécie. Os presentes resultados corroboram com a alta instabilidade da espécie *trans*- em comparação com a espécie *cis*- verificado experimentalmente em estudo de “shelf-life”.

Figura 42. Gráfico de contorno para o orbital molecular virtual ocupado de mais alta energia (HOMO) para as estruturas otimizadas da (A) *cis*-isohumulona e da (B) *trans*-isohumulona.

Os dados, apresentados na **Tabela 4**, são pertinentes para a predição da reatividade dos iso- α -ácidos, pois é possível afirmar que estas reações são passíveis de ocorrerem preferencialmente via abstração de átomo de hidrogênio, tanto na mistura de IAAs, quanto para os isômeros separadamente, pois para que haja transferência de elétrons, que é um processo basicamente controlado por entropia, a entalpia de ativação deve ser baixa (5-10 kJ mol⁻¹) e a entropia de ativação deve ser mais negativa, pois neste processo há uma maior organização no solvente^{50,51}.

O processo de oxidação via mecanismo de abstração de átomo de hidrogênio alílico é ainda suportado pela manutenção da reatividade dos iso- α -ácidos na sua forma molecular (protonada) já que sabidamente o potencial de oxidação do grupo β -tricetônico é deslocado para valores superiores ao potencial de redução do radical DPPH• quando comparado com a espécie aniônica, ou seja, termodinamicamente inviabilizando a reação⁴³.

Na **Tabela 4** é possível observar uma pequena diferença significativa ($p=0,05$) nos valores da constante de velocidade específica em etanol ($k_2 = 3,0 \pm 0,2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C) e em etanol acidificado com 1% de ácido fórmico ($k_2 = 2,0 \pm 0,2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25 °C). Esta diferença pode ser a princípio atribuída à diferença de polaridade no solvente.

Comparando os valores das constantes de velocidade específica da reação dos IAAs com o radical DPPH• com o valor citado na literatura do composto fenólico mais abundante na cerveja, o ácido ferúlico (0,2 mg/L de cerveja e $k_1 = 118 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{52, 53}, é possível afirmar que as reações entre IAAs e radicais formados na cerveja, pode degradar os IAAs, cuja concentração em cervejas Lager é em média 100 vezes mais que o ácido ferúlico⁵⁴. Sendo assim, podemos especular que a fotodegradação parcial das isohumulonas, mesmo na presença de supressores químicos do estado tripleto excitado da riboflavina, **Tabela 3**, ocorre em função dos radicais gerados pelo processo de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina.

4.5. Produtos de degradação das *trans*-isohumulonas após reação com DPPH•

Para identificar os produtos de reação das *trans*-isohumulonas com o DPPH• as amostras reagidas em diferentes concentrações e não reagidas foram separadas e analisadas por cromatografia líquida hifenada com um espectrômetro de massas utilizando interface de ionização por electrospray (ESI).

A **Figura 43** ilustra os cromatogramas das reações nas proporções 1:1 de *trans*-isohumulonas/DPPH• (em vermelho) e da reação em 10:1 de *trans*-isohumulonas/DPPH• (em azul).

Comparando a amostra após reação com o radical DPPH• na razão molar de 1:1 (*trans*-isohumulona/DPPH•) em etanol acidificado com 1% de ácido fórmico até não haver mais absorção em 520 nm (**Figura 44**) é possível observar que houve consumo significativo das *trans*-isohumulonas de 31%, calculado pelas áreas dos picos mostrados na **Tabela 5**.

De acordo com a estequiometria da reação obtida anteriormente, era esperado que houvesse consumo 50% das isohumulonas, porém foi apenas de 31%. Este decréscimo no consumo das isohumulonas pode ter ocorrido pelo tempo de reação muito prolongado (24hs) associado ao decaimento natural DPPH•, que em meio de etanol acidificado 1% de ácido fórmico foi medido em 16% após oito horas.

Figura 43. Cromatograma obtido após o término da reação entre as *trans*-isohumulonas e o radical DPPH• em etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C. Linha azul: obtido para uma mistura reacional contendo 1,2 mmol L⁻¹ de *trans*-isohumulonas e 0,12 mmol L⁻¹ de DPPH•. Linha vermelho: obtido para uma mistura reacional contendo 1,2 mmol L⁻¹ *trans*-isohumulonas e 1,2 mmol L⁻¹ de DPPH•. (a) Cromatograma total; (b) Detalhe dos picos 1 a 8; (c) Detalhe dos picos 9 a 14; (d) Detalhe dos picos 14 a 16.

Figura 44. Espectro UV-Vis indicando o término da reação (após 24 h) das *trans*-isohumulonas com DPPH•, devido à ausência de absorção em 520 nm.

Tabela 5. Áreas e identidades dos picos marcados na Figura 41

Picos	Composto	Massa [M-H] ⁻	Área da amostra não reagida	Área da amostra reagida
9	<i>trans</i> -isohumulona	347	420767931	280697315
10	<i>trans</i> -isohumulona	347	532270454	355219960
11	<i>trans</i> -isohumulona	361	846592033	644951998
12	<i>trans</i> -isohumulona	361	1346402255	896099312
14	<i>trans</i> -isohumulona	361	119630467	36320478

A partir do cromatograma de reação em condição de pseudo primeira ordem, ilustrada na **Figura 45a e 45b** é possível observar a formação de produtos de degradação oriundos do radical DPPH, como os HO-DPPH-H ($[M-H]^- = 410$ m/z), o NO₂-DPPH-H ($[M-H]^- = 439$ m/z) e o DPPH-H ($[M-H]^- = 394$ m/z)⁵⁵, cujas massas foram identificadas pelo cromatograma de íon extraído do cromatograma total de íons, como é mostrado na **Figura 45b** os cromatogramas dos íons extraídos das respectivas relações massa/carga $[M-H]^- = 410$ m/z (verde), $[M-H]^- = 439$ m/z (vermelho) e $[M-H]^- = 394$ m/z (azul). Comparando a área do pico do DPPH-H com o cromatograma da solução do radical DPPH•, no mesmo tempo de retenção é possível afirmar que esta espécie DPPH-H é formada durante a reação do radical DPPH•

com os IAAs, pois não há picos no cromatograma da solução do radical no mesmo tempo de retenção.

Figura 45. Cromatograma obtido após o término da reação entre as *trans*-isohumulonas e o radical DPPH• em etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C em condições de pseudo-primeira ordem. (a) Cromatograma de íon total; (b) Cromatograma de íon extraído: 410 m/z (verde); 394 m/z (vermelho); 439 m/z (azul).

Pela **Figura 45b** tem-se a seguinte proporção na formação destes compostos: 5,4% HO-DPPH-H; 21,7% NO₂-DPPH-H; 72,9% DPPH-H.

Além da identificação pelos cromatogramas e espectros de massa é possível observar espectro de diferença de absorbância, mostrado na **Figura 46**, tendo como linha de base uma solução de DPPH• na mesma concentração das condições reacionais, a formação de uma espécie cromófora em com máximo de absorbância em 355nm, referente à formação do NO₂-DPPH-H. Pelo espectro não é possível identificar a formação do DPPH-H ($\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$) que foi identificado no espectrometria de massas, bem como não é possível identificar a formação do HO-DPPH-H ($\lambda_{\text{max}} = 302 \text{ nm}$), pois a solução é feita em etanol acidificado com 1% de ácido fórmico e o ácido fórmico absorve abaixo de 310 nm.

Figura 46. Espectro de diferença de absorbância da curva de cinética espectrofotométrica dos IAAs com o radical DPPH•.

Na tentativa de identificar os produtos de reação oriundos da degradação dos IAAs, foram feitos a espectrometria de massas de múltiplo estágio sobre os dois íons mais abundantes em cada ponto do cromatograma. O cromatograma de íon total está ilustrado na **Figura 47**.

Figura 47. Cromatograma de íon total obtido após a reação das *trans*-isohumulonas com o radical DPPH• (azul) etanol com 1% de ácido fórmico a 25 °C; Cromatograma de íon total somente das *trans*-isohumulonas (vermelho).

As informações obtidas pela segunda fragmentação são importantes na elucidação das estruturas dos produtos de reação oriundos da degradação das *trans*-isohumulonas, pois fornecem base para esses estudos, mas não são suficientes para se obter conclusões a respeito desses produtos. Seria necessário separar os produtos de degradação via cromatografia semi-preparativa, concentrar cada produto e submetê-los a análises de ressonância magnética nuclear.

Os espectros de massa da primeira e da segunda fragmentação referente aos picos enumerados na **Figura 47** são mostrados nas figuras subsequentes.

Na **Figura 48** é possível verificar que íon precursor de massa $[M-H]^- = 447 \text{ m/z}$ é o íon que gera os íons produtos $[M-H]^- = 379 \text{ m/z}$ e o $[M-H]^- = 347 \text{ m/z}$. Isso indica que provavelmente a espécie formada na reação possui massa igual a 448 g mol^{-1} .

Figura 48. Espectros de massa referentes ao pico 1 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 379 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 447 m/z.

Análogo a figura anterior, na **Figura 49**, o íon precursor de massa $[M-H]^- = 445$ m/z é responsável pela geração do íon produto de massa $[M-H]^- = 377$ m/z e este se fragmenta em diversos íons como pode ser observado na **Figura 49b**. Indicando que a massa da espécie formada na reação possa ser 446 g mol^{-1} .

Figura 49. Espectros de massa referentes ao pico 2 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 445 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 377 m/z.

Já na **Figura 50**, correspondente a ao pico 3 da **Figura 47**, deve ter ocorrido coeluição de duas espécies distintas, pois íons precursores de massas $[M-H]^- = 393$ m/z e $[M-H]^- = 379$ m/z geram fragmentos com massas distintas, $[M-H]^- = 361$ m/z e $[M-H]^- = 347$ m/z respectivamente. A diferença de massa entre esses íons é 14 unidades, que é igual à diferença de massa entre a *co-trans*-isohumulona e as *n*- e *ad-trans*-isohumulona. A massa perdida na fragmentação desses íons precursores para o íon produto majoritário é idêntica e com valor de 32 unidades, essa perda de massa pode estar relacionada à perda de um grupo hidroxiperoxila ou de dois grupos hidroxila. Porém, se estivesse relacionada a dois grupos hidroxila, provavelmente ocorreria a formação de um íon fragmento com intensidade semelhante ao íon produto majoritário de massa intermediária (ex: $[M-H]^- = 376$ ou 377 m/z) entre os íons precursores (ex: $[M-H]^- = 393$ m/z) e os íons produtos (ex: $[M-H]^- = 361$ m/z), mas é observado nas **Figuras 50b e c** apenas um íon intermediário com baixa intensidade em

relação ao íon produto majoritário. A formação deste produto está relacionada a adição de oxigênio molecular com alguma espécie intermediária radicalar, pois a reação é permitida por spin e tem velocidade controlada por difusão, sendo muito rápida, tendo em vista que as reações foram realizadas na presença de oxigênio atmosférico.

Figura 50. Espectros de massa referentes ao pico 3 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 393 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 379 m/z.

No pico 4 da **Figura 47**, cujos espectros de massa estão ilustrados na **Figura 51**, também pode ter ocorrido coeluição de compostos distintos, por motivos análogos aos explicados anteriormente. Nas **Figuras 51a e d** está ilustrado o espectro de massa do pico 4 da **Figura 47** e seu respectivo espectro da segunda fragmentação do íon $[M-H]^+ = 365$ m/z, esse íon quebra formando um fragmento de massa 165 m/z, um íon de mesma massa com um fragmento semelhante foi descrito por Intelmann *et al.*⁵⁶ como produto da degradação térmica dos IAAs, cuja estrutura está ilustrada na **Figura 52**. Este composto é detectado em

quantidades muito pequenas na amostra somente de *trans*-, porém não sendo possível quantificar, pois a relação sinal-ruído não é superior a 10.

Figura 51. Espectros de massa referentes ao pico 4 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 461 m/z; (c) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 393 m/z; (d) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 365 m/z.

Figura 52. Estrutura do produto de degradação térmica dos IAAs, com $[M-H]^- = 365 \text{ m/z}$ ⁵⁶.

O pico 5 mostrado na **Figura 47** foi anteriormente atribuído a um produto de reação oriundo do radical DPPH• e o espectro de massa referente a esse pico está mostrado na **Figura 53**.

Figura 53. Espectros de massa referentes ao pico 5 da Figura 47. (a) Espectro de massa da primeira fragmentação; (b) Espectro de massa da segunda fragmentação do pico isolado 410 m/z;

Os picos de 6 a 9 mostrados na **Figura 47** são das *trans*-isohumulonas, como já foi discutido previamente, para a **Figura 43**.

Por esses dados apenas não é possível elucidar estruturas dos produtos de degradação, porém são informações importantes tanto para as estruturas quanto para o mecanismo de reação do radical DPPH• com as *trans*-isohumulonas.

4.6. Reatividade da L-metionina com Riboflavina no Estado Tripleto Excitado

($^3\text{FMN}^*$)

Leite e produtos derivados estão susceptíveis a exposição de luz durante os processos de produção, embalagem, distribuição e estocagem, resultando na deterioração da qualidade do produto. Estes processos oxidativos causam perda de valor nutricional, formação de compostos tóxicos e compostos de aroma não desejáveis, que são decisivos na aceitação do produto pelo consumidor^{57, 58}.

A riboflavina, vitamina B₂, e compostos derivados da riboflavina, como a riboflavina 5'-monofosfato de sódio (FMN), estão entre os fotosensibilizadores mais importantes em sistemas biológicos e induzem a fotooxidação de várias biomoléculas em alimentos e é um importante constituinte do leite e cerveja³⁹. É sabido que a riboflavina absorve luz visível, 440 nm, como é mostrado no espectro da **Figura 54**, indo ao estado singlete excitado e, por cruzamento intersistemas (ISC), decai ao estado tripleto excitado que pode reagir com um substrato formando o radical neutro da riboflavina que reduz o oxigênio molecular (tipo I) ou ser desativado fisicamente pelo oxigênio (tipo II), como foi descrito anteriormente, mostrado nas **Figuras 4 e 5**.

Figura 54. Espectro de absorção de radiação UV-Vis da riboflavina, o pico de 440 nm foi o utilizado nos experimentos.

Foram feitos experimentos de rendimento quântico da fotorreação da riboflavina com a L-metionina sob atmosfera inerte e na presença de oxigênio e em água deuterada.

Os rendimentos quânticos obtidos experimentalmente foram feitos com o método previamente descrito na seção experimental e para quantificar a degradação foi monitorado a quantidade de dimetildissulfeto (DMDS) formado na reação, a partir de um método descrito na literatura para dimetilssulfeto (DMS)³¹, são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Rendimentos quânticos da reação de degradação da L-metionina, fotossensibilizada por FMN, irradiado por 30 minutos

Amostra	Concentração formada de DMDS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Intensidade da fonte luminosa, I (Einstein.min ⁻¹)	Rendimento quântico, Φ (mol.Einstein ⁻¹)
H ₂ O, com O ₂	20,7	$2,46 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-2}$
H ₂ O, sem O ₂	8,52	$2,46 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-3}$
D ₂ O, com O ₂	85,1	$4,54 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-2}$

É possível observar pela tabela, que há diferença significativa nos rendimentos quânticos, com variação em conta da presença de oxigênio ou não do oxigênio e um pequeno aumento em água deuterada, na qual o tempo de vida do oxigênio singlete é maior⁵⁹ e, por isso, degrada a L-metionina com maior eficiência.

Com isso nos resíduos de metionina em cadeias protéicas o mecanismo proposto para formação do dimetildissulfeto é o tipo II, via oxigênio singlete. Entretanto, devido à cinética de reação de desativação da riboflavina via mecanismo tipo I radicalóide por diversos substratos^{60, 61 e 62}, a formação deste composto de aroma indesejável é decorrente da ação de outros sensibilizadores presentes na matriz, tais como a clorofila e protoporfirinas⁶³. Desta forma, mais experimentos, que estão em andamento em nosso Laboratório, são necessários

para um maior esclarecimento do mecanismo de formação de DMDS em produtos lácteos e cerveja.

5. CONCLUSÕES

Foi possível constatar que os IAAs são protegidos da fotooxidação sensibilizada por flavinas na presença de oxigênio molecular e dos compostos fenólicos majoritários presentes na cerveja, como o ácido p-coumárico e o ácido ferúlico, isso ocorre devido à capacidade destes em desativar o estado tripleto excitado da riboflavina. Entretanto, tal efeito protetor observado pela presença de compostos fenólicos não é um efeito antioxidante de “parada de reação”, mas sim um efeito “retardador” do processo deteriorativo. Além disso, ocorre a formação de dímeros e trímeros destes compostos fenólicos, que foram separados e identificados por cromatografia líquida hifenada a espectrometria de massas de múltiplo estágio.

No entanto, não foi observada reatividade dos IAAs frente ao radical superóxido nas condições experimentais utilizadas.

Para isolar os diastereoisômeros com sucesso, foi utilizado o método de complexação das *trans*-isohumulonas com a β -ciclodextrina, seguida da precipitação desse complexo, descrito na sessão experimental. Com isso foi possível estudar a reatividade de cada diastereoisômero individualmente frente ao radical DPPH•.

Esses estudos de reatividade frente ao radical DPPH•, permitiu determinar a capacidade antioxidante, que é a capacidade em captar radicais, que foi determinada como 2:1 (DPPH•:IAAs), que está intrinsecamente ligados aos hidrogênios alílicos dos grupos prenilas dos IAAs. Com os dados das constantes de velocidade foi possível verificar que os IAAs, na concentração comumente encontrada na cerveja, são passíveis de competição com compostos fenólicos na captação de radicais.

Além disso, determinado os parâmetros de ativação da reação do radical DPPH• com os IAAs é possível averiguar que o mecanismo de ação radicalar ocorre via HAT/PCET.

Como produtos de degradação da reação do radical DPPH• com as *trans*-isohumulonas, foram encontrados DPPH-H, HO-DPPH-H e o NO₂-DPPH-H como produtos oriundos do radical DPPH•. Por outro lado, os produtos oriundos das *trans*-isohumulonas, não foram passíveis de identificação, pois são necessários estudos complementares de ressonância magnética nuclear para ser possível a elucidação das estruturas, no entanto, foi possível observar a adição de oxigênio molecular à estrutura das *trans*-isohumulonas após a oxidação em um elétron inicial, pela espectrometria de massas, porém não possível afirmar em qual sítio reacional a reação se procede.

Esses estudos de estruturas dos produtos de reação são importantes para a elucidação do mecanismo de reação e os resultados reportados são importantes para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

1. GRIGG, D. Wine, spirits and beer: world patterns of consumption. **Geography**, v. 89, p. 99-110, 2004.
2. SILVA, J.B. A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. p. 347-356.
3. DE KEUKELEIRE, D.; HUVAERE, K. Shining light on the photodecomposition of beer. **The Spectrum**, v. 18, n. 2, p. 18-25, 2005.
4. HORNSEY, I. **A history of beer and brewing**. Cambridge: RSC Paperback, 2004. p. 632;
5. LINTNER, C. **Lehrbuch der Bierbrauerei**. Braunschweig: Verlag Vieweg und Sohn, 1875. p. 343.
6. BRAND, J. Zur Prüfung des Bierflaschenglases auf seine Schutzwirkung gegenüber dem Einfluß des Lichtes. **Zeitschrift für das gesamte Brauwesen**, v. 31, n. 30, p. 333-335, 1908.
7. DE CLERK, J. rH and its application in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 40, p. 407-419, 1934.
8. GRAY, P. P. STONE, I.; ROTHSCHILD, H. The action of sunlight in beer. **Wallerstein Communications**, v. 4, p. 29-40, 1941.
9. JACOBSSON, B.; HÖGBERG, B. The sensivity of beer to light. Protection afforded by glass bottles. **Wallerstein Communications**, v. 10, p. 5-16, 1947.
10. KUROIWA, Y.; HASHIMOTO, H. Composition of sunstruck flavor substance and mechanism of its evolution. **Proceeding American Society Brewing Chemistry**, v. 19, p. 28-36, 1961.
11. KUROIWA, Y.; HASHIMOTO, H. Studies on hops with reference to their role in the evolution of sunstruck flavor of beer. **Report of the Research Laboratory of Kirin Brewery Co Ltd**, v. 4, p. 35-40, 1961.
12. TEMPLAR, J.; ARRIGAN, K.; SIMPSON, W. J. Formation, measurement and significance of lightstruck flavor in beer: a review. **Brewers Digest**, v. 70, n. 5, p. 18-25, 1995.
13. VERZELE, M.; DE DEKEUKELEIRE, D. **Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 417.

14. SAKUMA, S.; RIKIMARU, Y.; KOBAYASHI, K.; KOWAKA, M. Sunstruck Flavor Formation in Beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 49, n. 4, p. 162-165, 1991.
15. KOZIOL, J. Studies on flavins in organic solvents I. Spectral characteristics of riboflavin, riboflavin tetrabutryate and lumichrome. **Photochemistry and Photobiology**, v. 4, p. 41-54, 1966.
16. BOWD, A.; BYROM, P.; HUDSON, J. B.; TURNBULL, J. H. Excited states of flavine coenzymes-III. fluorescence and phosphorescence emissions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 8, p. 1-10, 1968.
17. HUVAERE, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H.; HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D. Photooxidative degradation of beer bittering principles: a key Step on the route to lightstruck flavor formation in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1489-1494, 2005.
18. IRWIN, A. J.; BORDELEAU, L.; BARKER, R. L. Model studies and flavor threshold determination of 3-methyl-2-butene-1-thiol in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, n. 1, p. 1-3, 1993;
19. WOOD, W. F. **Chemistry of skunk spray**. 1998. Disponível em: <<http://www.humboldt.edu/~wfw2/chemofskunkspray.html>>. Acesso em: 26 fev. 2010.
20. GUINARD, J. X.; YIP, D.; CUBERO, E.; MAZZUCHELLI, R. Quality ratings by experts, and relation with descriptive analysis ratings: a case study with beer. **Food Quality and Preference**, v. 10, n. 1, p. 59-67, 1999.
21. STEPHENSON, W. H.; BAMFORTH, C. W. The impact of lightstruck and stale character in beers on their perceived quality: a consumer study. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 4, p. 406-409, 2002.
22. BURNS, C.S.; HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D.; FORBES, M. D. E.; Mechanism for formation of the lightstruck flavor in beer revealed by time resolved electron paramagnetic resonance. **Chemistry - A European Journal**, v. 7, n. 21, p. 4554-4560, 2001.
23. HUVAERE, K. **Studies on the mechanism of formation of the lighstruck flavor in beer**. 2004. 155 f. Tese (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Bélgica, 2004.
24. MANESIOTIS, P.; BORRELLI, C.; AURELIANO, C. S. A.; SVENSSONB, C.; SELLERGREN, B. Water-compatible imprinted polymers for selective depletion of riboflavin from beverages. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 6185-6193, 2009.

25. GOLDSMITH, M. R.; ROGERS, P. J.; CABRAL, N. M.; GHIGGINO, K. P.; RODDICK, F. A. Riboflavin triplet quenchers inhibit lightstruck flavor formation in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, n. 4, p. 177-184, 2005.
26. CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Phenol and terpene quenching of singlet- and triplet-excited states of riboflavin in relation to lightstruck flavor formation in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5630-5636, 2006.
27. FOTI, M.; INGOLD, K. U.; LUSZTYK, J. The surprisingly high reactivity of phenoxyl radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 21, p. 9440-9447, 1994.
28. KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2161-2168, 2002.
29. SIMONI, D. A.; ANDRADE, J. C.; FAIGLE, J. F. G.; SIMONI, J. A. Um experimento com propostas múltiplas para um laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1034-1039, 2002.
30. CALVERT, J. G.; PITTS, J. N. Experimental methods in photochemistry. In: **Photochemistry**. New York: John Wiley, 1966. p. 783-786.
31. CARDOSO, D. R.; ANDRADE SOBRINHO, L. G.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. A rapid and sensitive method for dimethylsulphide analysis in Brazilian sugar cane spirits and other distilled beverages. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 277-281, 2004.
32. ROUBAUD, V.; SANKARAPANDI, S.; KUPPUSAMY, P.; TORDO, P.; ZWEIER, J. L. Quantitative measurement of superoxide generation using the spin trap 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 404-411, 1997.
33. OLSON, J. S.; BALLOU, D. P.; PALMER, G.; MASSEY, V. The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 14, p. 4350-4362, 1974.
34. HODGES, G. R.; YOUNG, M. J.; PAUL, T.; INGOLD, K. U. How should xanthine oxidase-generated superoxide yields be measured. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 5, p. 434-441, 2000.
35. VAN GELDER, B. F.; SLATER, E. C. The extinction coefficient of cytochrome c. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 58, p. 593-595, 1962.

36. KHATIB, A.; ZHANG, H. R.; WILSON, E. G.; SUPARDI, M.; VERPOORTE, R. Isolation of individual hop iso- α -acids stereoisomers by β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 354-357, 2010.
37. MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **The Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
38. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
39. BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. Heidelberg: Springer, 2004. p.1071.
40. VANHOENACKER, G.; DE KEUKELEIRE, D.; SANDRA, P. Analysis of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, p. 53-61, 2004.
41. HUVAERE, K.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H.; HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D. Riboflavin-sensitized photooxidation of isohumulones and derivatives. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, p. 337-340, 2004.
42. SASTRY, G. S.; HAMRA, R. E.; POOL, K. H. Spectrophotometric determination of dissolved oxygen in water. **Analytical Chemistry**, v. 41, p. 857-858, 1969.
43. HUVAERE, K.; ANDERSEN, M. L.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H.; HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D. Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. **Chemistry - A European Journal**, v. 9, p. 4693-4699, 2003.
44. SAWYER, D. T.; VALENTINE, J. S. How super is superoxide?. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, p. 393-400, 1981.
45. KOPPENOL, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Letters**, v. 264, n. 2, p. 165-167, 1990.
46. SAWYER, D. T.; GIBIAN, M. J. The chemistry of superoxide ion. **Tetrahedron**, v. 35, p. 1471-1481, 1979.
47. LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in Alcohols. **The Journal of the Organic Chemistry**, v. 68, p. 3433-3438, 2003.

48. KEUSCH, P. **Eyring Equation**. University of Regensburg. Disponível em: <http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/eyr-e.htm>. Acesso em: 26 fev. 2010.
49. ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre, Bookman, 2006, p. 965.
50. MEYER, T. J. Proton-coupled electron transfer: a reaction chemist's view. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 55, p. 363-390, 2004.
51. MEYER, T. J.; HUYNH, M. H. V. Proton-coupled electron transfer. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 5004-5064, 2007.
52. MONTANARI, L.; PERRETTI, G.; NATELLA, F.; GUIDI, A.; FANTOZZI, P. Organic and phenolic acids in beer. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 32, n. 8, p. 535-539, 1999.
53. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.
54. VANHOENACKER, G.; DE KEUKELEIRE, D.; SANDRA, P. Analysis of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 53-61, 2004.
55. IONITA, P. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species?. **Chemical Papers**, v. 59, n. 1, p. 11-16, 2005.
56. INTELMAAN, D.; KUMMERLÖWE, G.; HASELEU, G.; DESMER, N.; SCHULZE, K.; FRÖHLICH, R.; FRANK, O.; LUY, B.; HOFMANN, T. Structures of storage-induced transformation products of beer's bitter principles, revealed by sophisticated NMR spectroscopic and LC-MS techniques. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, p. 13047-13058, 2009.
57. BRADLEY, R. L. J. Effect of light on alteration of nutritional value and flavour of milk: a review. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 314-320, 1980.
58. SKIBSTED, L. H. Light-induced changes in dairy products. **Bulletins International Dairy Federation**, v. 346, p. 4-9, 2000.
59. LINDIG, B. A.; RODGERS, M. A. J.; SCHAAP, A. P. Determination of the lifetime of singlet oxygen in D₂O using 9,10-anthracenepropionic acid, a water soluble probe. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, p. 5590-5593, 1980.

60. CARDOSO, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; OLSEN, K.; DA SILVA, A. B. F.; FRANCO, D. W.; SKIBSTED, L. H. Deactivation of tripletexcited riboflavin by purine derivatives: important role of uric acid in light induced oxidation of milk sensitized by riboflavin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3679-3684, 2005.
61. CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6602-6606, 2004.
62. BECKER, E. M.; CARDOSO, D. R.; SKIBSTED, L. H. Deactivation of riboflavin triplet-excited state by phenolic antioxidants: mechanism behind protective effects in photooxidation of milk based beverages. **European Food Research Technology**, v. 221, p. 382-386, 2005.
63. WOLD, J. P.; VEBERG, A.; NILSEN, A.; IANI, V.; JUZENAS, P.; MOAN, J. The role of naturally occurring chlorophyll next term and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 343-353, 2005.