Msc. Natália Ellen Castilho de Almeida

Reatividade das lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados e compostos contendo grupos tióis livre frente aos radicais formados durante o envelhecimento da cerveja

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em química.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos
2014

*A minha avó Maria (in memoriam) pelo
amor eterno, exemplo e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Fátima por estarem sempre ao meu lado. “O meu Deus é o Deus do impossível”.

A minha família e ao meu marido Gustavo pela paciência, amor e ajuda.

Ao Prof. Dr. Daniel R. Cardoso pela orientação, confiança e amizade.

Aos amigos Wendel e Márcia por compartilharem momentos bons e difíceis.

A Rafaela, Luiza e Leandro pelo companheirismo desde 2004 (Turma de Bacharelado do IQSC-USP).

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica e Inorgânica, IQSC-USP, pela convivência, em especial ao técnico Thiago (Fofo) e ao Dr. Willy pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração.

Às bibliotecárias Eliana, Bernadete e Wilneide pelo carinho, auxílio e amizade.

Às técnicas de ensino Cidinha e Renatinha pela amizade.

A Dra. Inara Aguiar pela realização dos cálculos teóricos.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho pela realização da análise MALDI-TOFF (DQ – UFSCar).

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges pelo auxílio no isolamento e purificação da proteína *LTP1* (IQSC – USP).

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP) pela infraestrutura e oportunidade.

A Universidade de Copenhagen, Dinamarca, pela disponibilidade na realização do doutorado-sanduiche. Em especial, ao Prof. Dr. Mogens L. Andersen e Marianne L. Lametsch pela orientação.

A FAPESP pelos auxílios financeiros (bolsa doutorado nacional e BEPE).

***"O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é
um oceano"***

(Galileu Galilei)

RESUMO

A reatividade das lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados e compostos contendo grupos tióis livre foi avaliada frente ao radical 1-hidroxietila (HER) para melhor conhecer o balanço redox da cerveja. As constantes de velocidade aparentes (k_{ap}) para a reação entre HER e os substratos supracitados foram obtidas via cinética de competição utilizando a armadilha química 4-POBN como competidor e monitorando-se o aduto radical formado por RPE. A partir dos valores obtidos de k_{ap} ($10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para as lupulonas, 10^5 a $10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para terpenos, $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para os flavonoides prenilados, e 10^8 a $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para tióis) e pelas concentrações médias destes compostos na cerveja, pôde-se inferir que a extensão da degradação térmica destes compostos na bebida aumenta na ordem: lupulonas > tióis > flavonoides prenilados > terpenos. Os produtos de reação foram identificados por espectrometria de massas, e através de investigações eletroquímicas e cálculos *ab initio* empregando-se *DFT* se propôs um mecanismo de reação. Os produtos de degradação pela reação com HER foram: derivados hidroxilados e compostos de adição do radical HER para as lupulonas; derivados hidroxilados para os terpenos; derivados de adição do radical HER para os flavonoides prenilados; e dissulfetos para os tióis. Em experimento similar foram determinadas as k_{ap} para a reação entre metil ésteres derivados de ácidos graxos insaturados e esteróis com o HER, cujos valores de k_{ap} variaram de $(2,7 \pm 0,1) \times 10^7$ até $(5,2 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o metil docosahexanoato e ergosterol, respectivamente. Os dados cinéticos aqui obtidos contribuem para um melhor conhecimento da degradação térmica oxidativa da cerveja, bem como sugerem que os polifenóis prenilados podem conferir um significativo efeito antioxidante ao organismo humano quando do seu consumo e absorção.

ABSTRACT

The reactivity of lupulones, terpenes, prenylated flavonoids and thiol-containing compounds was evaluated towards the 1-hydroxyethyl radical (HER) to provide a better knowledge of the redox balance of beer. The apparent rate constants (k_{ap}) for the reaction between HER and the substrates were obtained through a competitive kinetic approach using the spin-trap 4-POBN as a competitor and by monitoring the radical adduct by EPR. From the obtained values of k_{ap} ($10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for lupulones, from 10^5 to $10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for terpenes, $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for prenylated flavonoids, and from 10^8 to $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ thiol compounds) and the average concentrations of these compounds in beer, it is possible to infer that the extension of the thermal degradation on the beverage is enhanced according to: lupulones > thiol compounds > prenylated flavonoids > terpenes. The reaction products were identified by mass spectrometry, and by electrochemical investigations and *ab initio* (DFT) calculation, a reaction mechanism has been proposed. The degradation products for the reaction with HER were: hydroxide derivatives and HER addition products for the lupulones; hydroxide derivatives for terpenes; HER addition derivatives for prenylated flavonoids; and disulfides for thiol compounds. In similar experiments it was determined the k_{ap} for the reaction among methyl ester derivatives of unsaturated fatty acids and sterols with HER, with k_{ap} values ranging from $(2.7 \pm 0.1) \times 10^7$ to $(5.2 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for the methyl docosahexanoate and ergosterol, respectively. The obtained kinetic data may contribute for a better knowledge of the thermal oxidative degradation of beer, as well as may suggest that prenylated polyphenols could present a significant antioxidant effect in the human body through its consumption and absorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma simplificado do processo industrial cervejeiro	17
Figura 2 - Representação da estrutura química das humulonas (a) e lupulonas (b): (a-i) n-humulona, (a-ii) cohumulona, (a-iii) adhumulona, (b-i) n-lupulona, (b-ii) colupulona, (b-iii) adlupulona	20
Figura 3 - Representação das estruturas químicas dos principais terpenos presentes no óleo essencial derivado do lúpulo: terpenos alcenos (a) β -mirceno, (b) limoneno, (c) terpinoleno, (d) <i>p</i> -cimeno, (e) 1,8-cineole, (f) α -pineno, (g) β -pineno, (h) α -humuleno, (i) β -cariofileno, (j) <i>trans</i> - β -farneseno; terpenos álcoois: (k) β -citronelol, (l) geraniol, (m) linalol, (n) α -terpineol, (o) carvacrol, (p) timol, (q) α -eugenol, (r) nerolidol	23
Figura 4 - Representação das estruturas químicas dos flavonoides prenilados derivado do lúpulo: (a) xantohumol, (b) desmetilxantohumol, (c) isoxantohumol, (d) 8-prenilnaringenina, (e) 6-prenilnaringenina	24
Figura 5 - Fluxograma do mecanismo de biossíntese dos compostos contendo grupos tióis livre pelas leveduras <i>Saccharomyces</i>	26
Figura 6 - Representação das estruturas químicas dos compostos contendo grupos tióis livre e bloqueados, e aminoácidos: (a) cisteína; (b) glutatona; (c) Cys-Gly; (d) cisteína metil éster; (e) His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp; (f) homocisteína; (g) DTT; (h) Asn-Arg-Cys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Cys-Trp-Asn; (i) cistina; (j) glutatona oxidada; (k) metionina; (l) S-metil-L-cisteína; (m) histidina; (n) serina; (o) triptofano; (p) lisina	39
Figura 7 - Representação das estruturas químicas (a) colesterol, (b) ergosterol, (c) metil oleato, (d) metil linoleato, (e) metil linolenato, (f) metil araquidonato, (g) metil docosahexanoato, (h) metil linoleato conjugado (9E,11E)	41
Figura 8 - Espectros de RPE obtidos experimentalmente para a formação do aduto radical com concentrações crescentes de isoxantohumol (mol L^{-1}): (a) $2,6 \cdot 10^{-5}$; (b) $4,4 \cdot 10^{-5}$, (c) $6,2 \cdot 10^{-5}$. As reações foram conduzidas em soluções saturadas de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$	53
Figura 9 - Gráfico $(F/F-1) \cdot k_2 \cdot [4\text{-POBN}]$ versus concentração de isoxantohumol. Experimentos realizados pela técnica de <i>spin-trapping</i> RPE, a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e tempo total de reação de 1 minuto	55
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos das lupulonas em sua forma molecular, em acetonitrila contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte. Eletrodos: diamante dopado com boro (trabalho), platina (contra-eletrodo), ferroceno (referência interna). As velocidades de varredura foram (mV s^{-1}): (a) = 10, (b) = 50, (c) = 100, (d) = 200	57
Figura 11 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação das lupulonas e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,7 \text{ min}$ (eluato A). (c) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,1 \text{ min}$ (eluato B). (d) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,1 \text{ min}$ (eluato C). (e) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,8 \text{ min}$ (eluato D). (f) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,3 \text{ min}$ (eluato E)	58

Figura 12 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica deuterada (etanol- d_6) contendo os produtos decorrentes da reação das lupulonas e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,7$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,1$ min (eluato B). (d) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,1$ min (eluato C). (e) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,8$ min (eluato D). (f) Espectro de massas (<i>ESI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,3$ min (eluato E)	61
Figura 13 - Representação das possíveis ligações C-H envolvidas na abstração do átomo de hidrogênio das lupulonas pelo radical HER	66
Figura 14 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do terpinoleno e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (<i>APCI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,0$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (<i>APCI-(+)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 9,0 - 11,4$ min (eluato B)	70
Figura 15 - Representação das estruturas químicas da (a) quercetina, (b) naringenina	75
Figura 16 - Representação das configurações espaciais e das superfícies de contorno dos orbitais moleculares de fronteira desocupados de menor energia (<i>LUMO</i>) e ocupados (<i>HOMO</i>) de maior energia calculadas para os (a) xantohumol e (b) isoxantohumol	77
Figura 17 - Representação das possíveis ligações C-H e O-H envolvidas na abstração do átomo de hidrogênio dos flavonoides prenilados pelo radical HER. (a) xantohumol; (b) isoxantohumol; (c) 6-prenilnaringenina; (d) 8-prenilnaringenina	78
Figura 18 - Diagrama de energia dos orbitais de fronteira <i>HOMO</i> e <i>LUMO</i> dos flavonoides prenilados e do orbital de fronteira <i>SOMO</i> do radical HER	80
Figura 19 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do xantohumol e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,2$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,0$ min (eluato B). (d) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,7$ min (eluato C). (e) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 23,0$ min (eluato D)	82
Figura 20 - Representação das estruturas químicas do (a) cinamaldeído e (b) ácido p-coumárico	87
Figura 21 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do isoxantohumol e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 16,0$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,6$ min (eluato B)	88
Figura 22 - Cromatograma resultante da etapa de isolamento da proteína <i>LTP1</i> por cromatografia de troca catiônica	90
Figura 23 - Géis de <i>SDS-PAGE</i> (18% - acrilamida) decorrentes da análise das frações coletadas no processo de isolamento da proteína <i>LTP1</i> . Análise do padrão de massa molecular (1) e das frações coletadas por processo de separação por cromatografia de troca catiônica (2-9)	91

Figura 24 - Cromatograma resultante da etapa da purificação da proteína <i>LTP1</i> por cromatografia de exclusão molecular	91
Figura 25 - Géis de <i>SDS-PAGE</i> (18% - acrilamida) decorrentes da análise das frações coletadas no processo de purificação da proteína <i>LTP1</i> . Análise do padrão de massa molecular (1) e das frações coletadas por processo de separação por cromatografia de exclusão molecular (2-7)	92
Figura 26 - Espectro de Massas decorrente da análise por <i>MALDI-TOF-MS</i> da proteína <i>LTP1</i> isolada	93
Figura 27 - Estrutura quaternária da proteína <i>LTP1</i> oxidada ⁶⁵ . Figura gerada a partir do software Weblab Viewer Lite	95
Figura 28 - Gráfico $(F/F-1) \cdot k_2 \cdot [4\text{-POBN}]$ versus concentração de cisteína (A) e glutatona (B) em meio normal (—■—) e deuterado (—●—). Medidas obtidas pela análise das áreas dos espectros de RPE. $T = 25,0 \pm 0,2$ °C; 1 minuto de reação	96
Figura 29 - Espectro de massas (<i>HESI-II-(-)-MS</i>) da mistura reacional entre a glutatona e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação	98
Figura 30 - Cromatograma resultante da análise de tióis presentes na cerveja #4. Bandas de eluição A, em $t_r = 5,6$ min, e B, em $t_r = 7,4$ min, correspondem aos eluatos derivados do sulfito; banda de eluição C, em $t_r = 11,2$ min, corresponde ao eluato derivado dos compostos contendo grupos tióis	101
Figura 31 - Cromatograma resultante da análise de tióis totais contidos na cerveja #4. Bandas de eluição A, em $t_r = 5,6$ min, e B, em $t_r = 7,4$ min, correspondem aos eluatos derivados do sulfito; banda de eluição C, em $t_r = 14,9$ min, corresponde ao eluato derivado do excesso de TCEP adicionado; banda de eluição D, em $t_r = 18,2$ min, corresponde aos eluatos derivados dos compostos contendo grupos tióis	102
Figura 32 - Concentração total de compostos contendo tióis livre em diferentes cervejas versus concentração de TCEP adicionado	102
Figura 33 - Curva de calibração para (A) glutatona e (B) glutatona oxidada em tampão Tris- ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5) após a adição de diferentes concentrações de TCEP (mol L^{-1}): (—●—) $2,5 \cdot 10^{-4}$; (—▲—) $4,5 \cdot 10^{-4}$	103
Figura 34 - Concentração de tióis presentes (a) e totais (b) em diferentes cervejas versus concentração de proteína total determinada pelo método de Bradford	105
Figura 35 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ medida por RPE após o período de indução em amostras da cerveja #4 submetidas a um envelhecimento aeróbico acelerado ($60,0 \pm 0,2$ °C) contendo diferentes concentrações de glutatona (mol L^{-1}): (—◇—) 0,0; (—□—) $1,0 \cdot 10^{-3}$; (—△—) $2,0 \cdot 10^{-3}$	106
Figura 36 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ analisado por RPE após o período de indução (“lag phase”) em amostras da cerveja #4 contendo diferentes concentrações de TCEP (mol L^{-1}): (a) 0,0; (b) $1,0 \cdot 10^{-4}$; (c) $2,5 \cdot 10^{-4}$ e (c) $5,0 \cdot 10^{-4}$; submetidas a um envelhecimento aeróbico acelerado ($60,0 \pm 0,2$ °C)	107
Figura 37 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ medida por RPE em soluções aquosas modelo contendo etanol (5,8% v/v), 4 mL de 4-POBN ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 80 μL de H_2O_2 ($24,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 20 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($22,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e diferentes concentrações de TCEP (de 0,1 a $40,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	108
Figura 38 - Formação do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})]$ pela adição de TCEP em diferentes concentrações de FeCl_3 (mol L^{-1}): (a) $1,8 \cdot 10^{-5}$; (b) $3,7 \cdot 10^{-5}$; (c) $7,4 \cdot 10^{-5}$	109
Figura 39 - Gráfico das constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e ésteres derivados dos ácidos graxos insaturados versus número de grupos metilênicos (bis)alílicos dos substratos	11

- Figura 40** - Voltamogramas cíclicos do (a) metil linoleato conjugado e (b) ergosterol, 112
em acetonitrila contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio como eletrólito
suporte. Eletrodos: platina (trabalho e contra-eletrodo), ferroceno (referência interna).
Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1}
- Figura 41** - Diagrama de energia dos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* do 1,3- e 113
1,4-hexadieno e do orbital de fronteira *SOMO* do radical HER
- Figura 42** - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos 115
decorrentes da reação do metil linoleato e o radical HER, sob atmosfera de Ar, $T = 25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*HESI-II-(+)-MS*) com
atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,0 \text{ min}$ (eluato B). (c) Espectro de massas (*HESI-II-*
(+)-*MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,9 \text{ min}$ (eluato D)
- Figura 43** - Espectro de absorção do transiente alusivo ao radical fenoxila. Solução 121
irradiada em $\lambda = 355 \text{ nm}$ contendo di-*tert*-butil-peróxido (70 % v/v) e fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$;
em acetonitrila), sob atmosfera de Ar e mantida a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Figura 44** - Curva de decaimento exponencial de primeira-ordem referente ao transiente 121
alusivo ao radical fenoxila. Solução irradiada em $\lambda = 355 \text{ nm}$ contendo di-*tert*-butil-
peróxido (70 % v/v) e fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila), sob atmosfera de Ar e
mantida a temperatura de $25 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\lambda_{\text{(leitura)}} = 390 \text{ nm}$

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de isomerização térmica das humulonas à <i>trans</i> - (a) e <i>cis</i> -isohumulonas (b) durante o cozimento do mosto fermentado e adicionado de lúpulo. (a-i) <i>trans</i> -n-isohumulona, (a-ii) <i>trans</i> -co-isohumulona, (a-iii) <i>trans</i> -ad-isohumulona, (b-i) <i>cis</i> -n-isolupulona, (b-ii) <i>cis</i> -co-isolupulona, (b-iii) <i>cis</i> -ad-isolupulona	20
Esquema 2 - Proposta de mecanismo antioxidante de proteínas contendo grupo tiol (Pr-SH) na cerveja. Adaptado de Rogers e Clarke	27
Esquema 3 - Representação da Reação de Fenton	28
Esquema 4 - Formação e reações subsequentes do radical 1-hidroxietila (HER), em destaque, e 2-hidroxietila em cerveja, de acordo com o proposto por Andersen e Skibsted	29
Esquema 5 - Reação de formação do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$	37
Esquema 6 - Ilustração da reação de competição entre a armadilha química 4-POBN e os compostos de interesse (lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados, tióis e lipídeos) pelo radical HER	38
Esquema 7 - Ilustração da reação entre o ácido sulfênico e a dimedona e formação do aduto monitorado por espectrometria de massas	45
Esquema 8 - Mecanismo de redução das pontes de dissulfeto pelo TCEP	48
Esquema 9 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre as lupulonas e o radical HER	64
Esquema 10 - Ilustração da formação dos possíveis radicais durante a reação entre o α -pineno e o radical HER	68
Esquema 11 - Ilustração da formação dos possíveis radicais durante a reação entre o β -citronelol e o radical HER	68
Esquema 12 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o terpinoleno e o radical HER	72
Esquema 13 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o xantohumol e o radical HER	85
Esquema 14 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o isoxantohumol e o radical HER	89
Esquema 15 - Mecanismo proposto para a reação entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre	99
Esquema 16 - Mecanismo da reação de derivatização do ThiolGlo-1 e sulfito e tiol proposto por Abrahamsoon	100
Esquema 17 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o metil linoleato e o radical HER	117
Esquema 18 - Ilustração da reação de formação do radical fenoxila a partir da irradiação do di- <i>tert</i> -butilperóxido em $\lambda = 355 \text{ nm}$	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constantes de velocidade aparentes de reação entre o radical HER e terpenos determinadas por <i>spin-trapping</i> RPE, em 1 minuto de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C	67
Tabela 2 - Constantes de velocidade aparentes para a reação entre o radical HER e flavonoides prenilados determinadas por <i>spin-trapping</i> RPE, em 1 minuto de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C	74
Tabela 3 - Propriedades eletrônicas dos flavonoides prenilados calculadas usando o método <i>DFT</i> e a base 6-311++g(2d,2p)	76
Tabela 4 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre e bloqueado, bem como aminoácidos, determinadas por <i>spin-trapping</i> RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C	94
Tabela 5 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e cisteína e glutathione em meio normal ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e deuterado ($\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$) determinadas por <i>spin-trapping</i> RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C	97
Tabela 6 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e os lipídeos determinadas por <i>spin-trapping</i> RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ArO [•]	- Radical fenoxila
APCI	- <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i>
BDE	- <i>Bond Dissociation Energy</i>
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i>
ca.	- Concentração analítica
C _H ⁺	- Concentração hidrogeniônica
λ	- Comprimento de onda
DFT	- <i>Density Functional Theory</i>
DTT	- (2S,3S)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
E _{HOMO}	- Energia do Orbital Molecular de Fronteira <i>HOMO</i>
E _{HOMO}	- Energia do Orbital Molecular de Fronteira <i>LUMO</i>
ENH	- Eletrodo Normal de Hidrogênio
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i>
ε	- Coeficiente de absorvidade molar
Fec/Fec ⁺¹	- Par do íon complexo ferroceno
HER	- <i>1-hydroxyethyl radical</i>
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HOMO	- <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HESI-II	- <i>Heated Electrospray Ionization</i>
IEF-PCM	- <i>Integral Equation Formalism as Polarizable Continuum Model</i>
k _{ap}	- Constante de velocidade aparente
LUMO	- <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
LTP1	- <i>Lipid Transfer Protein 1</i>
MALDI-TOF	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MS	- <i>Mass Spectrometer</i>
P.I.	- Pontencial de Ionização
4-POBN	- α-4-piridil-N-tert-butilnitrona-1-óxido
RSSR	- Molécula de tiol oxidada (ponte de dissulfeto)
RSH	- Molécula de tiol livre
RPE	- Ressonância Paramagnética de elétrons
SDS-PAGE	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOMO	- <i>Single Occupied Molecular Orbital</i>
TCEP	- tris(2-carboxietil)-fosfina
UPLC	- <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Epígrafe	
Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Esquemas	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODO	33
3.1. Reagentes	33
3.2. Isolamento, purificação e caracterização química da proteína <i>LTP1</i>	34
3.3. Investigação eletroquímica das lupulonas	35
3.4. Investigação eletroquímica do ergosterol e metil linoleato conjugado (9E,11E)	36
3.5. Reatividade dos compostos de interesse frente ao HER	36
3.5.1. Geração e detecção do radical HER	36
3.5.2. Determinação das constantes de velocidade aparentes decorrentes das reações dos compostos de interesse frente ao radical HER	38
3.6. Caracterização química dos produtos das reações	41
3.6.1. Reação entre o radical HER e as lupulonas	41
3.6.2. Reação entre o radical HER e os terpenos	43
3.6.3. Reação entre o radical HER e os flavonoides prenilados	43
3.6.4. Reação entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre	44
3.6.5. Reação entre o radical HER e lipídeos	45
3.7. Cálculos teóricos <i>ab initio</i> empregando a Teoria de Densidade Funcional (<i>DFT</i>)	46

3.8. Quantificação do teor de tióis – presentes e totais – contidos em diferentes cervejas	47
3.9. Quantificação do teor de proteína em diferentes cervejas	49
3.10. Investigação da estabilidade oxidativa conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre e adição de TCEP na cerveja	49
3.11. Ensaio na reação de Fenton conferido pelo TCEP	50
3.12. Ensaio de redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de TCEP	51
3.13. Reatividade das isohumulonas, lupulonas, terpenos e flavonoides prenilados frente ao radical fenoxila	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Reatividade dos compostos de interesse frente o radical HER	53
4.1.1. Investigação da reatividade das lupulonas frente ao radical HER	55
4.1.1.1. Estudo eletroquímico das lupulonas	56
4.1.1.2. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo as lupulonas e o radical HER	58
4.1.2. Investigação da reatividade dos terpenos frente ao radical HER	66
4.1.2.1. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os terpenos e o radical HER	69
4.1.3. Estudo da reatividade dos flavonoides prenilados frente ao radical HER	74
4.1.3.1. Cálculos quânticos das moléculas dos flavonoides prenilados	76
4.1.3.2. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os flavonoides prenilados e o radical HER	81
4.1.4. Investigação da reatividade dos compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER	90
4.1.4.1. Isolamento, purificação e caracterização química da proteína <i>LTP1</i>	90
4.1.4.2. Reatividade dos compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER	93
4.1.4.3. Identificação dos produtos da reação entre os compostos contendo grupos tióis livre e o radical HER	97
4.1.4.4. Quantificação do teor de tióis – presente e total – contidos em diferentes cervejas	99
4.1.4.5. Quantificação do teor de proteína em diferentes cervejas	104

4.1.4.6. Investigação da estabilidade redox conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre e pela adição de TCEP na cerveja	105
4.1.4.7. Influência do TCEP na reação de Fenton	107
4.1.4.8. Ensaio de redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de TCEP	108
4.1.5. Investigação da reatividade de diferentes lipídeos frente ao radical HER	109
4.1.5.1. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os metil ésteres não-conjugados derivados dos ácidos graxos e o radical HER	115
4.2. Comparação entre a reatividade apresentada pelos compostos de interesse frente o radical HER	118
4.3. Reatividade dos compostos de interesse frente ao radical fenoxila	120
5. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
APÊNDICES	

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é, por definição, uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico que tem atraído consumidores há mais de cem anos por apresentar atributos sensoriais peculiares, tais como o frescor, o aroma e o amargor característico¹. Por regulamentação, a cerveja é produzida a partir de água de boa qualidade, malte de cevada, fermento e lúpulo, podendo ainda ser utilizadas outras fontes de carboidratos como coadjutos tais como o arroz, o milho e o trigo^{1,2}.

O processo industrial para a produção de cerveja é ilustrado na **Figura 1**. O processo se inicia pela moagem do malte de cevada juntamente com a água, resultando em uma suspensão a qual é submetida ao aquecimento a temperatura de aproximadamente 60 °C. Durante esta etapa de aquecimento, as enzimas amilase e protease degradam o amido e as proteínas do malte, formando uma mistura de glicose e aminoácidos, também denominada de mosto doce.

Figura 1 - Fluxograma simplificado do processo industrial cervejeiro.

Após a etapa de filtração do mosto doce, ocorre a adição do lúpulo[#] e então se inicia o processo de fervura/cozimento do mosto doce através da aplicação de um gradiente de temperatura, podendo chegar até a temperatura de 95 °C, durante aproximadamente uma hora. Ao final deste processo de fervura, os materiais suspensos provenientes do lúpulo são retidos e a mistura é então resfriada para a adição das leveduras; dar-se-á a fermentação. Esta etapa é dividida em dois estágios: aeróbico e anaeróbico. No estágio aeróbico ocorre o crescimento das leveduras na presença de oxigênio, ao passo que no estágio anaeróbico as leveduras transformam a glicose em etanol e dióxido de carbono, sendo este último recuperado e armazenado para o reaproveitamento ao final do processo.

Existem dois tipos de leveduras que são tipicamente utilizadas no processo cervejeiro, *Saccharomyces carlsbergensis* e *Saccharomyces cerevisiae*, as quais conferem o tipo de fermentação empregado. Utilizando leveduras do tipo *Saccharomyces carlsbergensis* tem-se uma cerveja denominada de baixa fermentação, na qual as leveduras decantam durante a produção de etanol. Por outro lado, uma cerveja é tida como de alta fermentação quando são empregadas leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, as quais permanecem suspensas no final do processo e suportam altas concentrações de etanol.

Ao final da fermentação, as leveduras são removidas, obtendo uma cerveja denominada cerveja verde (do inglês “*green beer*”), a qual não é adequada ao consumo imediato por apresentar compostos de sabor e aroma indesejáveis. Logo, um período denominado de maturação é requerido, no qual a cerveja é mantida em torno de 0 °C por um tempo relativamente grande – podendo levar semanas – para que tais compostos sejam vagarosamente degradados, transformados ou evaporados até atingirem níveis de concentração abaixo de seus valores críticos – limiares de percepção. Ainda, é comumente empregada, ao final do processo cervejeiro, uma correção do amargor da cerveja a ser

[#] O lúpulo pode ser adicionado ao processo cervejeiro através da adição direta de flores secas (*in natura*), *pellets* ou extratos.

envasada, isto ocorre pela adição de extrato de ácidos amargos do lúpulo pré-isomerizado. Por fim, a cerveja segue para o envase, após filtração e adição de dióxido de carbono, podendo ainda passar ou não pelo processo de pasteurização^{3,4}.

A Lei da Pureza da Cerveja (do alemão “Reinheitsgebot”), promulgada pelo Duque Guilherme IV da Baviera em 1516 e instituída na Alemanha, permite apenas o uso do malte de cevada, água, lúpulo e fermento como ingredientes para a fabricação da cerveja^{3,5}. Desta forma, o uso do lúpulo no processo de fabricação da cerveja foi reforçado. Este ingrediente foi introduzido na cervejaria durante a Idade Média pelos monges europeus que refinaram as técnicas de produção^{3,5}. Inicialmente, o lúpulo era adicionado como um preservativo de ação bactericida de origem natural para que a cerveja pudesse ser estocada por longos períodos e para que não ocorresse fermentação secundária durante o processo de fabricação^{3,5}; porém, passou a ser um agente de aroma essencial e singular da cerveja, responsável pela distinção desta de qualquer outra bebida alcoólica carbonatada.

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta cuja composição química compreende uma gama muito grande de metabólitos secundários localizados especialmente em suas glândulas posicionadas atrás das brácteas da flor de lúpulo^{3,6}. Estas glândulas são cobertas com um pó resinoso de coloração amarelo chamado lupulina^{3,6}. Atualmente, sabe-se que as propriedades presentes na cerveja decorrentes da adição do lúpulo no processo cervejeiro são conferidas por uma classe especial de compostos contidos na resina de lupulina. Neste contexto, três classes de compostos são apontadas como sendo os principais metabólitos secundários do lúpulo, os quais compreendem os óleos essenciais (0,5 – 5 % v/m), os compostos fenólicos (3 – 6 % m/m) e os ácidos amargos α - e β -ácidos (4 – 30 % m/m), também denominados de humulonas e lupulonas, **Figura 2 (a) e (b)**, respectivamente^{3,6}.

Figura 2 - Representação da estrutura química das humulonas (a) e lupulonas (b): (a-i) n-humulona, (a-ii) cohumulona, (a-iii) adhumulona, (b-i) n-lupulona, (b-ii) colupulona, (b-iii) adlupulona.

Os α - e β -ácidos do lúpulo consistem em uma classe de compostos cuja composição majoritária compreende três análogos: (n)- (**Figura 2 (i)**), co- (**Figura 2 (ii)**) e ad- (**Figura 2 (iii)**), as quais são classificadas de acordo com a cadeia lateral acila (R)^{3,5}. Apesar de não possuírem impacto direto nas propriedades sensoriais da cerveja, os α -ácidos são os precursores dos iso- α -ácidos, comumente chamadas por isohumulonas, responsáveis pelo amargor característico e qualidade da espuma da cerveja^{7,8}. Neste contexto, as humulonas, pouco solúveis em meio aquoso (solubilidade de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; $pK_a \sim 5,5$)⁹⁻¹¹, são convertidas à espécies mais hidrofílicas, as isohumulonas (solubilidade de $270 \mu\text{g mL}^{-1}$; $pK_a \sim 3,0$)⁹⁻¹¹, durante o processo de fervura segundo ilustrado no **Esquema 1**.

Esquema 1 - Reação de isomerização térmica das humulonas à *trans*- (a) e *cis*-isohumulonas (b) durante o cozimento do mosto fermentado e adicionado de lúpulo. (a-i) *trans*-n-isohumulona, (a-ii) *trans*-co-isohumulona, (a-iii) *trans*-ad-isohumulona, (b-i) *cis*-n-isolupulona, (b-ii) *cis*-co-isolupulona, (b-iii) *cis*-ad-isolupulona⁷.

A ação antisséptica conferida pelo lúpulo tem sido foco de muitos estudos, os quais apontam que esta propriedade é devido a pronunciável atividade bacteriostática dos ácidos amargos resultante das interações hidrofóbicas das cadeias laterais prenila com a parede celular das bactérias Gram-positivas^{3,8, 12-19}. Logo, as lupulonas mostraram ser mais ativas que as humulonas e isohumulonas, uma vez que os β -ácidos apresentam três grupos prenila em sua cadeia lateral, ao passo que os α -ácidos e seus derivados isomerizados contêm apenas duas dessas cadeias laterais^{14,20}. Assim, as lupulonas atuam como ionóforos contra bactérias Gram-positivas ao impedir ou reduzir o seu crescimento^{12,17}.

Na cerveja, os ácidos amargos derivados do lúpulo inibem o crescimento dos *Lactobacillus* durante o processo de fervura sem interferir na fermentação⁸. No entanto, diversas aplicações tecnológicas vêm sendo desenvolvidas recentemente com a finalidade de explorar a atividade bacteriostática das lupulonas. Assim, o emprego das lupulonas no controle da atividade antibacteriana durante o processo de extração do açúcar da beterraba e na produção de etanol combustível tem se tornado uma prática corriqueira, cujo objetivo consiste no uso de bactericidas de origem natural em substituição aos antibióticos convencionais tradicionalmente utilizados, como a penicilina^{3,7,20}. Contudo, sabe-se que os β -ácidos são susceptíveis a sofrerem degradação oxidativa^{3,8}, resultando na possível perda de sua atividade antimicrobiana e formação de compostos que apresentam características organolépticas indesejáveis.

Outra classe de compostos de suma importância para a qualidade sensorial da cerveja consiste nos terpenos, os quais conferem um peculiar aroma para a bebida²¹⁻²⁵. Quimicamente os terpenos são classificados com base no número de átomos de carbono em suas moléculas e podem ser divididos em número de unidades de isopreno (C_5H_8)_n, sendo, portanto, hidrocarbonetos contendo ou não o átomo de oxigênio em suas estruturas químicas, bem como uma ou mais instaurações $C=C$ ^{25,26}. Neste contexto, os terpenos são classificados como:

monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40})²⁵⁻²⁷.

Os terpenos são metabólitos secundários de plantas oriundos da rota do mevalonato e produzidos, na maioria das vezes, como agentes de defesa contra microrganismos e insetos^{26,27}. Na cerveja, é sabido que os terpenos advêm do lúpulo²⁷ e contribuem para a acuidade sensorial da bebida ao conferir uma característica sensorial ímpar para o produto final^{21,22,24,27}. No entanto, sabe-se que a composição química das variedades comerciais de lúpulo depende de fatores pedoclimáticos, fato este determinante na maneira pela qual o lúpulo será adicionado ao processo cervejeiro, conferindo amargor e acabamento sensorial à bebida²⁴. Atualmente, a composição de óleos essenciais vem sendo empregada na caracterização das variedades de lúpulo e, desta forma, a identificação e quantificação dos terpenos presentes no cone do lúpulo tem se tornado uma prática bastante importante para a caracterização da variedade e da origem geográfica da planta de lúpulo^{21,24,27}.

Os terpenos majoritários identificados na cerveja consistem nos terpenos álcoois apresentados na **Figura 3 (k) a (r)**, em especial o linalol, geraniol e β -citronelol,^{22,28} os quais são formados a partir da biotransformação de terpenos alcenos, **Figura 3 (a) a (j)**, advindos do lúpulo. Análogo à cerveja, os terpenos álcoois estão presentes também no vinho, os quais advêm majoritariamente das uvas e contribuem para gerar as propriedades sensoriais da bebida²⁹⁻³¹. Contudo, alguns estudos têm reportado a suscetibilidade dos terpenos frente a processos oxidativos iniciados principalmente pela presença de oxigênio molecular e espécies radicalares, tais como o radical hidroxila ($\cdot OH$), formando, ao final da reação, peróxidos, hidroperóxidos e hidróxidos derivados^{26,32-34}. Tal reatividade foi relacionada à presença de insaturações na estrutura molecular dos terpenos, através da qual ocorre a abstração de átomos de hidrogênio alílico pelo radical oxidante²⁶.

Figura 3 - Representação das estruturas químicas dos principais terpenos presentes no óleo essencial derivado do lúpulo: terpenos alcenos (a) β -mirceno, (b) limoneno, (c) terpinoleno, (d) *p*-cimeno, (e) 1,8-cineole, (f) α -pineno, (g) β -pineno, (h) α -humuleno, (i) β -cariofileno, (j) *trans*- β -farneseno; terpenos álcoois: (k) β -citronelol, (l) geraniol, (m) linalol, (n) α -terpineol, (o) carvacrol, (p) timol, (q) α -eugenol, (r) nerolidol.

Outra classe de compostos que compõem os principais metabólitos secundários biosintetizados e acumulados na lupulina são os prenilflavonoides²⁷. Esta classe de compostos é comumente dividida em duas subclasses: as chalconas e as flavanonas preniladas³⁵. As principais chalconas preniladas do lúpulo incluem o xantohumol e o desmetilxantohumol, **Figura 4 (a) e (b)**, enquanto que as flavanonas majoritárias compreendem o isoxantohumol, 8-prenilnaringenina e 6-prenilnaringenina, **Figura 4 (c) a (e)**. Sabe-se que as flavanonas preniladas são decorrentes de reações de isomerização em consequência do tratamento térmico aplicado durante o processo de fervura empregado na fabricação da cerveja^{36,37}. Assim, o isoxantohumol é resultado da isomerização do xantohumol, sendo a 6- e a 8-prenilnaringenina os isômeros derivados do desmetilxantohumol³⁸.

Figura 4 - Representação das estruturas químicas dos flavonoides prenilados derivado do lúpulo: (a) xantohumol, (b) desmetilxantohumol, (c) isoxantohumol, (d) 8-prenilnaringenina, (e) 6-prenilnaringenina.

A cerveja é apontada como sendo a principal fonte de obtenção de flavonoides prenilados na dieta humana³⁶. Embora o xantohumol seja a espécie majoritária de flavonoides prenilados identificada no lúpulo (podendo representar até 1% m/m do cone seco do lúpulo³⁵), na cerveja, devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, a concentração média de xantohumol varia de $(0,1 \text{ a } 2,0) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ^{35,38}, sendo esta ainda menor para o desmetilxantohumol³⁸. Por outro lado, as flavanonas compõem as principais espécies de compostos fenólicos prenilados identificadas na cerveja, em especial o isoxantohumol, cuja concentração média identificada na bebida varia de $(0,1 \text{ a } 10,0) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ³⁹.

Os flavonoides prenilados têm despertado grande interesse no âmbito científico devido às suas propriedades farmacológicas^{15,35,36,40-43}. Neste contexto, estudos *in vitro* destes compostos têm revelado que o xantohumol apresenta um grande potencial para atuarem como agentes quimiopreventivos contra diversos tipos de câncer^{15,39,44-46}. Ainda, outros benefícios relacionados com a ingestão do mesmo composto encontram-se reportados na literatura, tais

como a inibição de inflamação e controle da obesidade^{36,47-49}. Trabalhos recentes na literatura têm sugerido que o isoxantohumol apresenta propriedades anti-inflamatórias^{35,50,51}.

Outra aplicação relacionada ao consumo de flavonoides prenilados consiste no uso da flavanona 8-prenilnaringenina no tratamento da menopausa por se tratar de um precursor de fitoestrogeno natural de maior eficácia descrito até o presente momento^{15,35,36,45}. Adicionalmente, alguns estudos têm se voltado para a avaliação da atividade antioxidante dos flavonoides prenilados, especialmente no meio biológico, os quais têm se revelado como antioxidantes em potencial, embora o mecanismo de ação seja ainda pouco conhecido^{15,52,53}.

Sabe-se que o consumo diário dos flavonóides prenilados ingeridos pelo consumo regular de cerveja é cerca de 0,14 mg³⁶, sendo este relativamente menor quando comparado com o conteúdo de polifenóis totais presentes na bebida (42 mg expresso em equivalentes de catequina)³⁶. Este fato torna a possível atividade antioxidante dos flavonóides prenilados pouco significativa do ponto de vista de sua concentração. Contudo, os polifenóis diferem dos prenilflavonoides pelo fato destes últimos apresentarem características mais lipofílicas³⁶, o que os tornam potenciais antioxidantes em cervejas contendo alto teor alcoólico, bem como aptos a atuarem na prevenção/minimização da lipoxidação na membrana celular e também aptos a uma maior absorção e transporte através da parede intestinal.

Outro grupo de compostos presentes na cerveja que tem despertado grande interesse no meio científico e tecnológico nos últimos anos é o íon sulfito e os compostos contendo grupos tióis livre. Neste aspecto, o íon sulfito tem sido apontado como sendo um eficiente antioxidante natural presente na cerveja⁵⁴⁻⁵⁶, o qual advém da assimilação do enxofre derivado do íon sulfato através da ação de certas enzimas durante a fermentação. O processo segue pela conversão do íon hidrogeno sulfito (HSO_3^-) a homocisteína, culminando na formação da cisteína e metionina, bem como demais compostos contendo grupos tióis, conforme ilustrado na **Figura 5**^{54,55,57-59}.

Figura 5 - Fluxograma do mecanismo de biossíntese dos compostos contendo grupos tióis livre pelas leveduras *Saccharomyces*^{54,57}.

Kaneda e colaboradores⁵⁸ estudaram o mecanismo da ação antioxidante do sulfito na bebida, o qual foi correlacionado com o consumo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e consequentemente, promovendo a inibição do progresso das reações radicalares ao formar íons sulfato inertes^{55,56,59,60}. Clarke e colaboradores^{60,61} sugeriram que proteínas contendo grupos tióis livre presentes na cerveja, juntamente com o íon hidrogeno sulfito, estão envolvidas em um complexo sistema redox. Neste contexto, acredita-se que estas proteínas são oxidadas inicialmente pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando ácidos sulfênicos (Pr-SOH), intermediários reativos, que reagem prontamente com outras proteínas contendo o grupo tiol, gerando dissulfetos (Pr-SS-R) que por sua vez são regenerados a tióis pelo íon HSO_3^- , conforme ilustrado no **Esquema 2**.

Esquema 2 - Proposta de mecanismo antioxidante de proteínas contendo grupo tiol (Pr-SH) na cerveja. Adaptado de Rogers e Clarke⁶⁰⁻⁶².

Os dissulfetos formados podem então ser reduzidos pelo íon hidrogênio sulfito, regenerando a proteína contendo o grupo tiol e então conferindo uma ação sinérgica entre tais compostos^{61,62}. Logo, compostos contendo grupos tióis livre, assim como o íon sulfito, atuam de forma positiva no balanço redox da cerveja⁶⁰.

Sabe-se que a concentração de compostos contendo grupos tióis livre presentes na cerveja varia de $(1,3 \text{ a } 4,6) \times 10^{-5} \text{ L mol}^{-1}$ equivalentes de glutathione⁶². De acordo com a literatura^{61,62}, as proteínas majoritárias identificadas na cerveja pertencem a uma classe de proteínas denominadas como *LTP1* (do inglês, “*Lipid Transfer Protein 1*”), as quais originam-se do malte e contêm oito resíduos de cisteína em sua estrutura molecular⁶³⁻⁶⁶. As proteínas *LTP1* apresentam massas moleculares na faixa de 9-10 kDa e um *pI* (ponto isoelétrico) em torno de 9, sendo caracterizadas pela sua estabilidade conferida pela presença de quatro pontes de dissulfeto formadas a partir dos resíduos de cisteína⁶³⁻⁶⁶.

As análises por eletroforese e espectrometria de massas sugerem que as proteínas *LTP1* podem sofrer modificações químicas durante o processo de malteamento, tais como reações de acilação e glicosilação, ao reagirem com compostos decorrentes da reação de Maillard^{63,66}. Em estudo realizado por Wu e colaboradores⁶¹ foi reportado que a proteína *LTP1* presente na cerveja fresca apresenta grupos tióis livre – oito resíduos de cisteína – o que

evidencia o fato das proteínas *LTP1* participarem de forma significativa no balanço redox da bebida^{55,59,61}.

Stoyanovsky e colaboradores⁶⁷ reportaram que a glutathione (GSH) reage prontamente com o radical 1-hidroxietila (HER), levando a formação do respectivo dissulfeto (GSSG). Recentemente, Kreitman⁶⁸ avaliaram as capacidades antioxidantes da glutathione e cisteína na captação do radical HER, as quais foram iguais a 87 e 88%, respectivamente. De fato, Andersen e Skibsted⁶⁹ demonstraram através de experimentos de “*spin-trapping*” e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) que o radical HER é a espécie radicalar predominante identificada na cerveja, sendo o mesmo resultado obtido por Elias e Andersen⁷⁰ analisando-se amostras de vinho.

Na cerveja o radical HER é proposto originar-se da reação entre o etanol (co-solvente; ca. $\sim 1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o qual advém da Reação de Fenton^{69,71}, conforme ilustrado nos **Esquemas 3 e 4**. Sabe-se que a concentração de radicais gerados durante o processo de envelhecimento natural da cerveja aumenta com o teor de oxigênio dissolvido, com elevadas temperaturas de armazenamento ou com o aumento das concentrações de alguns metais de transição, tais como íons de ferro e cobre⁷². Entretanto, devido à alta reatividade ($E^0 = + 2,7 \text{ V versus ENH}$) e baixa seletividade apresentada pelo radical hidroxila, este abstrai prontamente átomos de hidrogênio das moléculas do etanol com uma elevada constante de velocidade, igual a $1,9 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁹.

Esquema 3 - Representação da Reação de Fenton^{69,71}.

Esquema 4 - Formação e reações subsequentes do radical 1-hidroxietila (HER), em destaque, e 2-hidroxietila em cerveja, de acordo com o proposto por Andersen e Skibsted⁶⁹.

A abstração de átomo de hidrogênio ocorre preferencialmente (85%) no átomo de carbono C1 da molécula do etanol, formando o radical HER, sendo a abstração em menor extensão no átomo de carbono C2 (13%), resultando na geração do radical 2-hidroxietila⁶⁹. Sabe-se ainda que ambos os radicais formados durante a oxidação do etanol reagem prontamente com o oxigênio molecular (O_2), formando o radical hidroperoxila ($\cdot\text{OOH}$) e, ao final da reação, acetaldeído como produto principal⁶⁹.

Apesar de o radical HER ser a espécie radicalar predominante na cerveja, outras espécies radicalares são passíveis de serem formadas concomitantemente durante o processo de envelhecimento da bebida, e assim contribuindo também para a diminuição da estabilidade oxidativa do produto. Neste aspecto, o radical fenoxila ($\text{ArO}\cdot$) representa um dos principais radicais secundários presentes na cerveja, uma vez que este origina-se de reações de oxidação envolvendo compostos fenólicos, os quais estão presentes na bebida em teores consideráveis ($\sim 460 \text{ mg L}^{-1}$ expresso em equivalentes de ácido gálico)⁷³⁻⁷⁵.

De fato, quimicamente a cerveja pode ser considerada uma solução alcoólica com concentração hidrogeniônica (C_{H^+}) em torno de $10^{-4,2}$ mol L⁻¹, contendo centenas de substâncias dissolvidas⁷². Entretanto, os constituintes de uma cerveja fresca – recém-engarrafada – não estão em equilíbrio químico⁷². Termodinamicamente, uma garrafa de cerveja é um sistema fechado e irá empenhar-se para alcançar uma condição de menor energia e máxima entropia. Logo, diversas conversões de seus constituintes são termodinamicamente possíveis, sendo sua relevância para a qualidade de cerveja determinada, em sua maioria, pelas constantes de velocidades das reações[†] em condições práticas de armazenamento do produto⁷².

Com o aumento da exportação da cerveja, principalmente devido à globalização do mercado, problemas relacionados ao tempo de prateleira do produto (do inglês, “*shelf-life*”) se tornam de extrema importância para a indústria cervejeira. Sabe-se que a susceptibilidade da cerveja a sofrer diversas reações durante o seu armazenamento pode acarretar perdas no frescor e no valor nutricional agregado ao produto, bem como culminar no desenvolvimento de compostos que conferem aroma e sabor indesejáveis⁷². Assim, o conhecimento dos possíveis mecanismos e das constantes de velocidade específicas^λ das reações que ocasionam a perda da qualidade sensorial e nutricional da bebida pode auxiliar no desenvolvimento de técnicas e métodos para a conservação do produto.

Logo, uma investigação mais apurada sobre a reatividade dos ácidos amargos derivados do lúpulo, terpenos, flavonoides prenilados e compostos contendo grupos tióis livre frente aos radicais HER e fenoxila torna-se de suma importância para gerar um maior entendimento sobre os possíveis mecanismos de degradação destes compostos durante o processo de envelhecimento da cerveja.

[†] A velocidade de cada reação irá determinar a viabilidade de cada caminho e está intrinsecamente relacionada à constante de velocidade específica da reação e ao teor dos reagentes presentes no produto.

^λ Constante de velocidade específica refere-se a constante de velocidade determinada por métodos diretos.

Adicionalmente, o radical HER foi identificado como sendo um dos principais produtos formados na metabolização do etanol pelo Citocromo-c P450-monoxigenase microsomal do fígado⁷⁶⁻⁷⁸. Estudos *in vivo* utilizando armadilhas químicas (do inglês, “*spin-trap*”) em ratos submetidos à administração oral de altas concentrações de etanol têm relacionado a formação do radical HER com o surgimento de lesões hepáticas no organismo humano⁷⁸⁻⁸⁰. Neste contexto, o aumento na peroxidação lipídica, averiguado através do aumento na formação de produtos advindos da oxidação lipídica, como os lipohidroperóxidos, e ocasionado pelo consumo crônico do álcool, foi associado ao surgimento de doenças patológicas no fígado, tais como necroses e inflamações⁷⁸⁻⁸⁰. De fato, a intensificação da oxidação de lipídeos foi, neste caso, acompanhada pelo decréscimo dos níveis de antioxidantes glutathiona e vitamina E nos tecidos celulares, sendo ambos os processos oxidativos relacionados a possíveis reações desencadeadas pelo radical HER⁷⁸.

No entanto, pouco se conhece sobre a extensão do processo oxidativo provocado pelo radical HER a nível celular. Logo, uma investigação sobre as possíveis vias reacionais que o radical preferencialmente reage quando este é gerado no organismo torna-se fundamental para um maior entendimento sobre a extensão dos danos celulares provocados pelo consumo abusivo de bebidas alcoólicas.

2. OBJETIVOS

Aparte do melhor conhecimento a respeito do processo de deterioração oxidativa da cerveja, os principais objetivos e metas do presente trabalho podem ser resumidos conforme descrito a seguir:

- Investigação da reatividade das lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados e compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER;
- Determinação dos produtos majoritários decorrentes das reações supracitadas;
- Propor as principais rotas de degradação dos substratos de interesse na cerveja;
- Investigação da estabilidade oxidativa conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre ao monitorar o radical HER em amostras de cerveja dopadas com os substratos e submetidas à condição de envelhecimento acelerado;
- Determinação da concentração dos tióis presentes e totais em diferentes cervejas;
- Determinação da concentração total de proteínas presentes em diferentes cervejas;
- Investigação da reatividade dos substratos de interesse frente ao radical fenoxila;

Adicionalmente, propôs-se investigar a reatividade dos lipídeos frente ao radical HER com a finalidade de inferir possíveis correlações com o efeito protetor que os flavonoides prenilados podem conferir ao organismo humano contra os danos causados na membrana celular pelo radical HER.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes.

Acetonitrila, ácido clorídrico 36-38%, etanol, metanol e sulfito de sódio (Na_2SO_3) foram obtidos da J. T. Baker; ácido fórmico grau espectrométrico, cloreto de ferro (II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sulfato de ferro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tris(hidroximetil)-aminometano (tris), L-cisteína, N-acetil-L-cisteína, L-serina, L-triptofano, hidróxido de sódio e o peróxido de hidrogênio 30% foram obtidos da Merck; α -4-piridil-N-tert-butilnitrona-1-óxido (4-POBN), ferroceno, etanol deuterado ($\text{CD}_3\text{CD}_2\text{COD}$ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COD}$), óxido de deutério (D_2O), ácido trifluoracético 99%, 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazino-p-p'-ácido disulfônico (ferrozina), cloreto de ferro (III) (FeCl_3), cloreto de sódio, glicerol, perclorato de tetrabutylamônio, tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP), dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona), L-cistina, L-glutathiona, L-homocisteína, S-metil-L-cisteína, L-histidina, Cys-Gly, His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp, Asn-Arg-Cys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Cys-Trp-Asn, xantohumol, isoxantohumol, 6-prenilnaringenina, 8-prenilnaringenina, α -pineno, β -citronelol, geraniol, limoneno, linalol, terpinoleno, α -eugenol, cimeno, 1,8-cineole, β -mirceno, β -pineno, α -humuleno, β -cariofileno, β -farneseno, α -terpineol, nerol, nerolidol, carvacrol, timol, colesterol, ergosterol, metil oleato (C18:1), metil linoleato (C18:2), metil linolenato (C18:3), metil araquidonato (C20:4), metil docosahexanoato (C22:6) e metil linoleate conjugado (9E,11E, C18:2) foram obtidos da Sigma-Aldrich; reagente fluorescente de tiol ThiolGlo-1 foi obtido da Calbiochem; glutathiona oxidada (GSSG), L-metionina, hidrocloreto de cisteína-metil-éster e L-lisina foram obtidas da Fluka; (2S,3S)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol (DTT), ácido acético e 1-octanol foram obtidos comercialmente da AppliChem; reagente Bradford (corante para ensaio proteico), acrilamida, dodecil sulfato de sódio, persulfato de amônia e azul de bromofenol foram obtidos da BioRad Laboratories; BSA (do inglês, “*Bovine Serum Albumin*”) foi obtida comercialmente da

Thermo Scientific; os gases argônio (5,0), hidrogênio (4,5), hélio (5,0) e nitrogênio (5,0) foram obtidos da White Martins. As lupulonas (pureza de 67,8%) foram gentilmente cedidos pela empresa Hopsteiner. A água de alta pureza ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) utilizada foi previamente destilada e purificada utilizando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados sem prévio tratamento. Os solventes foram de grau cromatográfico (HPLC – do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”) utilizado sem prévio tratamento.

3.2. Isolamento, purificação e caracterização química da proteína *LTP1*.

Amostras de cerveja (12 garrafas; volume de 355 mL cada) foram desgaseificadas com o auxílio de um banho ultrassônico e liofilizado por 72 horas. Em seguida, o sólido foi resuspendido em 60 mL de tampão Tris-HCl (ca. $25,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) / NaCl (ca. $20,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e a solução resultante foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos a $4,0 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi então removido e submetido a diálise por 12 a 16 horas contra o tampão Tris-HCl (ca. $20,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) / NaCl (ca. $20,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a $4,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução dialisada foi submetida à purificação seguindo duas etapas de separações cromatográficas. A primeira consistiu na utilização de uma coluna catiônica Macro-prepTM High S Support resin (Bio Rad) acoplada ao sistema ÄKTA Prime plus device (Ge Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl (ca. $25,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) / NaCl (ca. $20,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), sendo a eluição da proteína de interesse realizada através da aplicação de um gradiente salino de NaCl (ca. de $20,0 \times 10^{-3}$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) em 100 mL, utilizando uma vazão da coluna cromatográfica igual a 5 mL min^{-1} . Foram coletadas frações a cada 5 mL, sendo as frações que continham a proteína *LTP1* submetidas à segunda etapa de separação cromatográfica. Aqui, empregou-se uma coluna de exclusão molecular Hiload Superdex 75pg prep-grade 16/60 (Ge Healthcare) acoplada ao

sistema ÄKTA Prime plus device (Ge Healthcare). A eluição da proteína foi realizada empregando-se um tampão Tris-HCl (ca. $25,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4) / NaCl (ca. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), vazão da coluna cromatográfica de 1 mL min^{-1} , no modo isocrático.

A eficácia de cada etapa de purificação foi checada através análise das frações de interesse por *SDS-PAGE* 18% - acrilamida (do inglês, “*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”), sendo a fração final, que continha a proteína *LTP1*, submetida à diálise contra o tampão Tris-HCl (ca. $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4), a $4,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 12 h sob diálise, a solução foi então liofilizada, sendo a proteína *LTP1* obtida ao final do processo submetida à caracterização química por espectrometria de massas (*MALDI-TOF* – do inglês, “*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*”).

Eletroforese em *SDS-PAGE* 18% - acrilamida: as amostras coletadas foram diluídas em tampão Tris-HCl (ca. $50,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,8; DTT ca. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%) e em seguida submetidas, juntamente com padrão de massa molecular (*PageRulerTM Unstained Protein Ladder* – Fermentas), à análise por eletroforese em *SDS-PAGE*. As análises por eletroforese foram realizadas empregando géis de empacotamento e separação a 5 e 18% m/m de acrilamida, respectivamente, aplicando-se uma voltagem constante de 200 V por 45 minutos. Em seguida, o gel foi corado por 10 minutos em solução de Coomassie Brilliant Blue R 0,2% em meio de metanol:ácido-acético:água 5:1:15 (v/v/v) e sendo empregado na descoloração do mesmo uma solução contendo ácido-acético:etanol:água 3:2:35 (v/v/v).

3.3. Investigação eletroquímica das lupulonas.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT100, utilizando-se o eletrodo de trabalho uma placa diamante dopado com boro, fabricado pela Adamant Technologies S.A., Suíça, com dopagem 8000 ppm de boro e

área superficial de 6,25 mm². O contra eletrodo utilizado foi uma rede de platina, cuja área superficial é de 15,0 mm². O potencial eletroquímico das espécies foi checado tendo como referência o potencial padrão do par do íon complexo ferroceno (Fec/Fec⁺¹). Neste caso, o potencial calculado é relatado contra o Eletrodo Normal de Hidrogênio (ENH) usando a conversão de $E^0 = + 0,630 \text{ V versus ENH}$ para o par redox Fec/Fec⁺¹, em meio de acetonitrila⁸¹.

As lupulonas (ca. $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram dissolvidas em uma solução contendo o eletrólito de suporte (perclorato de tetrabutylamônio – ca. $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila), sendo as medidas conduzidas a temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$), sob atmosfera inerte (N₂). A velocidade de varredura foi variada de 10 mV s^{-1} a 200 mV s^{-1} .

3.4. Investigação eletroquímica do ergosterol e metil linoleato conjugado (9E,11E).

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato PAR 264A, utilizando-se duas redes de platina (15,0 mm²) como eletrodo de trabalho e contra eletrodo. O potencial eletroquímico das espécies foi obtido tendo como referência interna o potencial padrão do par Fec/Fec⁺¹. Os compostos (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ergosterol; ca. $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de metil linoleato conjugado) foram previamente dissolvidos em uma solução contendo o eletrólito de suporte (perclorato de tetrabutylamônio – ca. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila), sendo as medidas efetuadas a temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$), sob atmosfera inerte (Ar), empregando-se a velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} .

3.5. Reatividade dos compostos de interesse frente ao HER.

3.5.1. Geração e detecção do radical HER.

O radical HER foi gerado a partir do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Entretanto, em função da dificuldade na detecção direta da maioria dos radicais devido a seus baixos tempos de meia

vida, o monitoramento do radical HER foi efetuado utilizando-se o 4-POBN como armadilha química, o qual reage com a espécie radical, conforme ilustrado no **Esquema 5**, formando o aduto radical [4-POBN/CH(CH₃)OH][•], segundo a constante de velocidade específica igual a $3,1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁸².

Esquema 5 - Reação de formação do aduto radical [4-POBN/CH(CH₃)OH][•].

A reação foi conduzida adicionando-se 60 μL de uma solução de íons de Fe(II) (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) levemente acidificada com ácido fórmico (pH $\sim 4,5$) a 1 mL de uma solução contendo o 4-POBN (ca. $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; a 6% (v/v) de etanol ca. 1 mol L^{-1}). A mistura reacional foi cuidadosamente desgaseificada com argônio (Ar) ou nitrogênio (N₂), seguida do acréscimo de 80 μL de solução de H₂O₂ 30% (ca. $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) para promover a formação do radical HER e posterior geração do aduto radical. Após 1 minuto de reação, a sonda química (aduto radical) foi então monitorada através da técnica RPE. A concentração analítica do peróxido de hidrogênio foi determinada através do seu espectro eletrônico de absorção ($\lambda = 240 \text{ nm}$; $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁸³.

Parâmetros instrumentais:

- RPE: Espectrômetro Bruker modelo EMX Plus operando na banda-X. Frequência de micro-ondas: $\sim 9,76 \text{ GHz}$; potência de micro-ondas: 1 mW; amplitude de modulação: 1 G.

3.5.2. Determinação das constantes de velocidade aparentes^f decorrentes das reações dos compostos de interesse frente ao radical HER.

Para estimar a reatividade dos compostos de interesse frente ao radical HER, determinou-se as constantes de velocidade aparentes das reações empregando-se uma abordagem de cinética de competição^{84,85}. Neste contexto, a armadilha 4-POBN compete com os substratos pela captação do radical HER formado, conforme ilustrado no **Esquema 6**.

Esquema 6 - Ilustração da reação de competição entre a armadilha química 4-POBN e os compostos de interesse (lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados, tióis e lipídeos) pelo radical HER.

Desta forma, os compostos em estudo foram primeiramente dissolvidos em etanol, com exceção do β -mirceno, dissolvido em hexano, e dos compostos contendo grupos tióis, dissolvidos em tampão acetato (pH = 4,5). A concentração analítica das lupulonas foi determinada através da leitura da absorbância da solução em $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 14.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁷.

Volumes diferentes da solução dos compostos de interesse foram adicionados em 60 μL de uma solução aquosa de íons de Fe(II) (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) levemente acidificada

^f Constante de velocidade aparente refere-se à constante de velocidade determinada por métodos indiretos.

com ácido fórmico (pH ~ 4,5) e 1 mL de uma solução de 4-POBN (ca. $3,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; a 6% (v/v) de etanol ca. 1 mol L^{-1}). Acrescentou-se então 80 μL da solução de H_2O_2 30% (ca. $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi conduzida em atmosfera inerte (Ar ou N_2) e monitorada depois de decorrido 1 minuto de reação através da leitura do sinal do aduto radical $[\text{4-POBN/CH}(\text{CH}_3)\text{OH}]^{\bullet}$ por RPE.

Como substratos, foram empregados as lupulonas, **Figura 2**, terpenos, **Figura 3**, e flavonoides prenilados, **Figura 4**. Ainda, avaliou-se a reatividade frente ao radical HER de compostos contendo grupos tióis livre, tais como cisteína, glutathiona, Cys-Gly, His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp, Asn-Arg-Cys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Cys-Trp-Asn, homocisteína, cisteína metil éster, N-acetilcisteína e DTT, bem como para compostos contendo grupos tióis bloqueados e pontes de dissulfeto, tais como metionina, S-metil-L-cisteína, e cistina e glutathiona oxidada, respectivamente. Ainda, foi avaliada a reatividade dos aminoácidos histidina, serina, triptofano e lisina, os quais são reconhecidamente suscetíveis à oxidação^{86,87}. A **Figura 6** apresenta as estruturas químicas dos compostos contendo grupos tióis livre e bloqueados, bem como dos aminoácidos supracitados.

Figura 6 - Representação das estruturas químicas dos compostos contendo grupos tióis livre e bloqueados, e aminoácidos: (a) cisteína; (b) glutathiona; (c) Cys-Gly; (d) cisteína metil éster; (e) His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp; (f) homocisteína; (g) DTT; (h) Asn-Arg-Cys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Cys-Trp-Asn; (i) cistina; (j) glutathiona oxidada; (k) metionina; (l) S-metil-L-cisteína; (m) histidina; (n) serina; (o) triptofano; (p) lisina.

(continua na página 40)

(conclusão da Figura 6)

Aferiu-se também a reatividade da proteína *LTP1* isolada de uma cerveja comercial frente ao radical de interesse, bem como para diferentes lipídeos, cujas estruturas químicas encontram-se representadas na **Figura 7**. Por fim, avaliou-se o efeito isotópico cinético das reações envolvendo a cisteína e glutatona ao conduzir as reações em meio deuterado (D_2O e CH_3CH_2OD).

Figura 7 - Representação das estruturas químicas (a) colesterol, (b) ergosterol, (c) metil oleato, (d) metil linoleato, (e) metil linolenato, (f) metil araquidonato, (g) metil docosahexanoato, (h) metil linoleato conjugado (9E,11E).

3.6. Caracterização química dos produtos das reações.

3.6.1. Reação entre o radical HER e as lupulonas.

Os produtos da reação entre as lupulonas e o radical HER foram tentativamente caracterizados por *HPLC-ESI-MSⁿ*. Neste contexto, a reação foi conduzida em atmosfera

inerte (Ar) pela adição de 100 μL da solução de H_2O_2 (ca. $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; em água Milli-Q) em uma solução contendo as lupulonas (ca. $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em etanol ou etanol deuterado- d_6) e 80 μL da solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; em solução levemente acidifica com ácido fórmico – pH $\sim 4,5$). Após 1 minuto de reação, a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, a mistura reacional seguiu para análise química.

- *HPLC-ESI-MSⁿ*: sistema *HPLC* (do inglês, “*High Performance Liquid Chromatography*”) Shimadzu Prominence LC20AD hifenado ao espectrômetro de massas de múltiplo estágio do tipo “*íon-trap*” Bruker modelo E4K utilizando-se interface de ionização por *electrospray* (*ESI* – do inglês, “*Electrospray Ionization*”).

Coluna cromatográfica: Agilent C-18 extended (5 μm , 2,1 x 150 mm); vazão da coluna cromatográfica de 0,3 mL min^{-1} ; fase móvel: solvente A – H_2O /Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v), solvente B – Acetonitrila/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v); gradiente 0 – 5 min: 0 – 30% de B em A, 5 – 15 min.: 30 – 70% de B em A, 15 - 50 min.: 70 – 90% de B em A, 50 – 55 min.: 90 – 90% de B em A, 55 – 60 min.: 90 – 0% de B em A.

Espectrômetro de Massas de múltiplos estágios (*MSⁿ* – do inglês, “*Mass Spectrometer*”): utilizou-se um divisor de fluxo na interface *electrospray* (*ESI*) na proporção 1:3. Condições de nebulização: pressão 30 psi, fluxo do gás (N_2) 9 L min^{-1} ; temperatura de desolvatação de $365 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem do capilar de 3500 V; modo de detecção de íons positivo.

Adicionalmente, os produtos da reação supracitada foram tentativamente identificados empregando-se um espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) equipado com interface *electrospray* (*HESI-II* – do inglês, “*Heated Electrospray Ionization*”). Neste contexto, a mistura reacional foi introduzida no espectrômetro pela infusão direta da amostra na fonte de ionização *electrospray* aplicando-se um fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, operando no modo de detecção de íons positivo.

3.6.2. Reação entre o radical HER e os terpenos.

Os produtos da reação entre os terpenos e o radical HER foram tentativamente identificados através da análise da mistura reacional por *UPLC-APCI-LTQ Orbitrap FT-MS*. A reação foi conduzida em atmosfera inerte (Ar) e iniciada pela adição de 100 µL da solução de H₂O₂ (ca. $5,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; em água Milli-Q) em uma solução contendo o terpinoleno (ca. $9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; em etanol) e 80 µL da solução de FeCl₂·4H₂O (ca. $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; em solução levemente acidificada com ácido fórmico – pH ~ 4,5). Após decorrido 1 minuto de reação, a $25,0 \pm 0,2$ °C, a mistura reacional seguiu para análise química.

UPLC-APCI-LTQ Orbitrap FT-MS: sistema *UPLC* (do inglês, “*Ultra Performance Liquid Chromatography*”) Thermo Scientific Accela 1250 hifenado ao espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) equipado com a interface de ionização química à pressão atmosférica *APCI* (do inglês, “*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*”), operando no modo de detecção positivo.

Coluna cromatográfica: Hypersil Gold C-18 (1,9 µm; 50 x 2,1 mm); vazão da coluna cromatográfica de 0,4 mL min⁻¹; fase móvel: solvente A – H₂O/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v), solvente B – Metanol/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v); gradiente 0 – 2 min: 5 – 30% de B em A, 2 – 12 min.: 30 – 40% de B em A, 12 - 15 min.: 40 – 45% de B em A, 15 – 20 min.: 45 – 70% de B em A, 20 – 22 min.: 70 – 80% de B em A, 22 – 24 min.: 80 – 90% de B em A, 24 – 26 min.: 90 – 90% de B em A (isocrático), 26 – 28 min.: 90 – 5% de B em A, 28 – 30 min.: 5 – 5% de B em A (isocrático).

3.6.3. Reação entre o radical HER e os flavonoides prenilados.

Os produtos da reação entre os flavonoides prenilados e o radical HER foram tentativamente identificados empregando-se a técnica *UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*.

Aqui, utilizou-se o xantohumol (ca. $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e isoxantohumol (ca. $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) como substratos, sendo a reação conduzida em atmosfera inerte (Ar) através da adição de 100 μL da solução de H_2O_2 (ca. $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; em água Milli-Q) em uma solução contendo os flavonoides e 80 μL da solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; em solução levemente acidifica com ácido fórmico – pH $\sim 4,5$). Após 1 minuto de incubação, a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, a mistura reacional seguiu para análise química.

UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS: Sistema *UPLC* Thermo Scientific Accela 1250 hifenado ao espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) equipado com interface *electrospray HESI-II*, operando no modo de detecção negativo.

Coluna cromatográfica: Hypersil Gold C-18 (1,9 μm ; 50 x 2,1 mm); vazão da coluna cromatográfica de 0,3 mL min^{-1} ; fase móvel: solvente A – H_2O /Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v), solvente B – Acetonitrila/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v); gradiente 0 – 2 min: 0 – 10% de B em A, 2 – 5 min.: 10 – 20% de B em A, 5 - 20 min.: 20 – 45% de B em A, 20 – 23 min.: 45 – 55% de B em A, 23 – 25 min.: 55 – 90% de B em A, 25 – 27 min.: 90 – 90% de B em A (isocrático), 27 – 30 min.: 90 – 0% de B em A.

3.6.4. Reação entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre.

Os produtos decorrentes da reação entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre foram caracterizados pela infusão direta da mistura reacional no espectrômetro de massas (*HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*). Neste contexto, a reação foi conduzida em atmosfera inerte (Ar) pela adição de 100 μL da solução de H_2O_2 (ca. $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; em água Milli-Q) em uma solução contendo glutathione (ca. $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em solução levemente acidifica com ácido fórmico – pH $\sim 4,5$ – contendo 6 % (v/v) de etanol) e 80 μL da solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ca. $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; em solução levemente acidifica com

ácido fórmico – pH ~ 4,5). Após 1 minuto de reação, a $25,0 \pm 0,2$ °C, a mistura reacional seguiu para análise utilizando-se um espectrômetro de massas de alta resolução (*HESI-II-LTQ orbitrap FT-MS*).

HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS: espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) equipado com interface *electrospray HESI-II*, operando no modo de detecção negativo, vazão de $5 \mu\text{L min}^{-1}$.

Verificou-se ainda se houve a formação do intermediário ácido sulfênico através da adição da dimedona à mistura reacional, a qual forma um aduto estável com o ácido sulfênico segundo a reação ilustra no **Esquema 7**. A solução final foi analisada por espectrometria de massas exata de ultra-alta resolução (*orbitrap FT-MS*).

Esquema 7 - Ilustração da reação entre o ácido sulfênico e a dimedona e formação do aduto monitorado por espectrometria de massas.

3.6.5. Reação entre o radical HER e lipídeos.

Os produtos da reação entre o radical HER e os lipídeos foram tentativamente identificados por *UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*. Neste contexto, a reação foi conduzida em atmosfera inerte (Ar) pela adição de 100 μL da solução de H_2O_2 (ca. $5,9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; em água Milli-Q) em uma solução contendo o metil linoleato (ca. $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em etanol) e 80 μL da solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ca. $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; em solução levemente acidifica com ácido fórmico – pH ~ 4,5). Após decorrido 1 minuto de reação, a $25,0 \pm 0,2$ °C, a mistura reacional seguiu para análise química.

UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS: Sistema *UPLC* Thermo Scientific Accela 1250 hifenado ao espectrômetro de massas exata de ultra-alta resolução *LTQ Orbitrap Velos FT-MS* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) equipado com interface *electrospray HESI-II*, operando no modo de detecção positivo.

Coluna cromatográfica: Hypersil Gold C-18 (1,9 μm ; 50 x 2,1 mm); vazão da coluna cromatográfica de 0,3 mL min⁻¹; fase móvel: solvente A – H₂O/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v), solvente B – Metanol/Ácido fórmico (99,9:0,1 v/v); gradiente 0 – 3 min: 40 – 40% de B em A (isocrático), 3 – 8 min.: 40 – 60% de B em A, 8 - 13 min.: 60 – 75% de B em A, 13 – 20 min.: 75 – 85% de B em A, 20 – 30 min.: 85 – 85% de B em A (isocrático).

3.7. Cálculos teóricos *ab initio* empregando a Teoria de Densidade Funcional (*DFT*).

Para a determinação das configurações espaciais mais estáveis das moléculas do xantohumol, isoxantohumol, 6-preilnaringenina e 8-prenilnaringenina, bem como para o cálculo das entalpias de dissociação dos hidrogênios *BDE* (do inglês, “*Bond-Dissociation Enthalpy*”), potências de ionização (P.I.) e energia dos orbitais de fronteira *HOMO* (do inglês, “*Highest Occupied Molecular Orbital*”) e *LUMO* (do inglês, “*Lowest Occupied Molecular Orbital*”) foi utilizado o cálculo de dinâmica molecular por *DFT* (do inglês, “*Density Functional Theory*”) com o método B3LYP, base 6-311++g (2d,2p), otimizando em um contínuo dielétrico simulado em etanol com o formalismo da equação integral como modelo contínuo polarizado (*IEF-PCM*). Na determinação das entalpias de dissociação dos átomos de hidrogênio das moléculas das lupulonas e do terpinoleno, bem como na obtenção das energias dos orbitais de fronteira *SOMO* (do inglês, “*Single Occupied Molecular Orbital*”) do radical HER e *HOMO* e *LUMO* dos dienos 1,3- e 1,4-hexadieno, utilizou-se o cálculo de dinâmica molecular por *DFT* com o método B3LYP, base 6-311++g (2d,2p), otimizando em um

contínuo dielétrico simulado em etanol para os β -ácidos, o terpeno, o radical HER e os dienos, com o formalismo da equação integral como modelo contínuo polarizado (*IEF-PCM*).

3.8. Quantificação do teor de tióis – presentes e totais – contidos em diferentes cervejas.

A quantificação do teor dos compostos contendo grupos tióis livre presentes em diferentes cervejas foi obtida ao empregar a metodologia estabelecida por Abrahamsson e colaboradores⁸⁹. Construiu-se, primeiramente, curvas de calibração para cada cerveja estudada ao empregar a glutathione como padrão interno e ThiolGlo-1 como agente derivatizante. Neste contexto, 100 mL de cada amostra de cerveja foi previamente degaseificada pela adição de 10 μ L de 1-octanol sob agitação por 5 minutos. Em seguida, as soluções de cerveja foram diluídas 10 vezes pela adição de 900 μ L de solução tampão Tris- (ca. 0,25 mol L⁻¹, pH = 7,5) em 100 μ L de cada cerveja, sendo 20 μ L de cada solução diluída transferida para "vials" contendo diferentes concentrações de glutathione (ca. (0,2 a 1,0) x 10⁻⁶ mol L⁻¹). A reação de derivatização foi então conduzida ao adicionar 100 μ L de ThiolGlo-1 (ca. 2,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; em solução tampão Tris- ca. 0,25 mol L⁻¹, pH = 7,5) em cada "vial", e após decorridos 5 minutos, 10 μ L de HCl (ca. 12 mol L⁻¹) foi adicionado. Os tióis derivados foram analisados através de um sistema cromatográfico *HPLC* equipado com um detector de fluorescência empregando-se o gradiente de eluição 1 (descrito abaixo).

Para a quantificação do teor de tióis totais contidos nas amostras de cerveja, foi empregado, como agente redutor, o TCEP, o qual reduz as pontes de dissulfeto⁹⁰, conforme ilustrado no **Esquema 8**. Assim, foram adicionado às amostras de cerveja degaseificadas diferentes concentrações de TCEP (em solução tampão Tris- ca. 0,25 mol L⁻¹, pH = 7,5) e, após 5 minutos de reação, o mesmo procedimento experimental supracitado para a

quantificação do teor de tióis presentes nas cervejas foi aplicado, empregando, neste caso, o gradiente de eluição 2 (descrito abaixo).

Esquema 8 - Mecanismo de redução das pontes de dissulfeto pelo TCEP⁹⁰.

Cromatografia Líquida (*HPLC*): todas as análises cromatográficas foram realizadas através de um cromatógrafo Agilent 1100 Series equipado com sistema de injeção automático G1313A “*autosampler*” e detector de fluorescência G1321A. As separações foram conferidas através da utilização de uma coluna Jupiter C18 (150 por 2,0 mm, 5 μ m, 300Å, Phenomenex, Torrance, CA) empregando-se, como fase móvel, água (fase móvel A) e metanol (fase móvel B), ambos acidificados com ácido trifluoracético (ca. $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, pH = 2,0). O volume de injeção foi de 20 μ L e a vazão da coluna cromatográfica de 0,5 mL min⁻¹. Na detecção dos tióis derivatizados, foram empregados os comprimentos de onda (λ) em 242 nm e 492 nm para a excitação e emissão, respectivamente.

O gradiente de eluição 1 foi iniciado no modo isocrático em 25% de B em A e, após decorridos 8 minutos, este foi instantaneamente elevado a 95% de B em A, e assim mantido por 6 minutos. Em seguida, a condição inicial (25% de B em A) foi imediatamente reestabelecida e sustentada por 7 minutos.

O gradiente de eluição 2 iniciou-se em 25% de B em A até os 3 primeiros minutos (modo isocrático), aplicando-se, em seguida, um gradiente de eluição linear até 30% de B em A por 17 minutos e, subsequentemente, até 95% de B em A em 2 minutos. Um modo isocrático (95% de B em A) foi aplicado por 6 minutos, sendo, em seguida, reestabelecida imediatamente a condição inicial (25% de B em A) e assim mantido por 2 minutos.

3.9. Quantificação do teor de proteína em diferentes cervejas.

A quantificação do teor de proteínas presentes em diferentes cervejas foi realizada ao empregar o método de Bradford⁹¹, no qual se utilizou a proteína *BSA* (do inglês, “*Bovine Serum Albumin*”) como padrão (ca. $(5,0 \text{ a } 25,0) \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$). Primeiramente, as cervejas (40 mL) foram desgaseificadas pela adição de 4 μL de 1-octanol sob agitação por 5 minutos. Em seguida, 20 μL de cada amostra de cerveja ou solução de *BSA* foram transferidos para as respectivas microcubetas e então acrescido 1 mL de uma solução diluída do reagente de Bradford (10 mL da solução de reagente de Bradford para 40 mL de água Milli-Q). As reações foram conduzidas a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, e as concentrações aferidas pela leitura da absorbância das amostras em $\lambda = 595 \text{ nm}$.

3.10. Investigação da estabilidade oxidativa conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre e adição de TCEP na cerveja.

Na investigação do real balanço redox que os tióis exercem sobre o produto acabado, amostras da cerveja #4 foram dopadas com glutatona e em seguida submetidas a um envelhecimento acelerado ($60,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A estabilidade oxidativa foi obtida através da avaliação do tempo de indução (do inglês, “*lag-phase*”^{§§}), conferida para cada amostra, de

^{§§} “*Lag-phase*” ou período de indução consiste, neste caso, no período em que a concentração da espécie radicalar mantém-se no estado estacionário. Após este período, verifica-se um aumento exponencial na concentração do radical.

acordo com o método descrito por Uchida e colaboradores⁹². Três alíquotas de 100 mL da cerveja #4 foram desgaseificadas pela adição de 10 µL de 1-octanol sob agitação por 5 minutos, sendo duas das alíquotas dopadas com diferentes concentrações de glutathione (ca. (1,0 e 2,0) x 10⁻³ mol L⁻¹). Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução de 4-POBN (ca. 3,2 x 10⁻³ mol L⁻¹, em água Milli-Q) e 300 µL de etanol, sendo, em seguida, as amostras incubadas a 60,0 ± 0,2 °C. O radical aduto [4-POBN/CH(CH₃)OH][•] foi então monitorado por RPE durante 3h50m, sendo as intensidades relativa do sinal referente ao aduto radical das amostras calculadas com base na intensidade do sinal do marcador interno constituído por um monocristal de MgO dopado com íons de Mn(II).

Na investigação da estabilidade oxidativa conferida pela adição de TCEP nas cervejas, empregou-se o mesmo método descrito previamente utilizando diferentes concentrações de TCEP (ca. (1,0, 2,5 e 5,0) x 10⁻⁴ mol L⁻¹) em substituição a glutathione. Por fim, as intensidades dos sinais referentes ao aduto radical formado foram normalizadas utilizando o sinal do padrão interno – monocristal de MgO dopado com íons de Mn(II).

3.11. Ensaio na reação de Fenton conferido pelo TCEP.

Para avaliar o efeito da adição de TCEP na reação de Fenton, 50 µL de diferentes concentrações de TCEP (ca. 1,0 x 10⁻⁵ a 40,0 x 10⁻³ mol L⁻¹; em solução tampão Tris – ca. 0,25 mol L⁻¹, pH = 7,5) foram adicionados em uma solução contendo 4 mL da solução de 4-POBN (ca. 3,2 x 10⁻³ mol L⁻¹; em água Milli-Q contendo 5,8% (v/v) de etanol) e 20 µL da solução de FeSO₄.7H₂O (ca. 2,2 x 10⁻² mol L⁻¹; em água Milli-Q). A reação de geração do radical HER foi então iniciada pela adição de 80 µL da solução de H₂O₂ (ca. 2,4 x 10⁻² mol L⁻¹; em água Milli-Q) a mistura supracitada termostatizada a 25,0 ± 0,2 °C. Após decorridos 2 minutos de reação, o radical aduto [4-POBN/CH(CH₃)OH][•] foi monitorado por

RPE, sendo o aumento da intensidade do sinal calculado em relação ao sinal verificado na solução controle (isenta do TCEP).

3.12. Ensaio de redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de TCEP.

A habilidade do TCEP em reduzir o íon Fe(III) a Fe(II) foi verificada empregando-se a ferrozina como agente complexante de íon de Fe(II), conforme reportado na literatura⁹³. Neste contexto, 100 µL de água Milli-Q foram adicionados em 25 µL de diferentes soluções contendo diferentes concentrações de TCEP (ca. (0,0, 0,9, 1,8, 3,7 e 7,4) x 10⁻⁵ mol L⁻¹; em água Milli-Q) e FeCl₃ (ca. (1,8, 3,7 e 7,4) x 10⁻⁵ mol L⁻¹; em água Milli-Q). Adicionou-se então 100 µL de ferrozina (ca. 5,0 x 10⁻⁴ L mol⁻¹; em água Milli-Q) em cada amostra preparada previamente e, após 1 minuto de reação, a leitura das absorbâncias das amostras em $\lambda = 560$ nm foram realizadas.

3.13. Reatividade das isohumulonas, lupulonas, terpenos e flavonoides prenilados frente ao radical fenoxila.

A reatividade dos substratos de interesse frente ao radical fenoxila (ArO[•]) foi avaliada aplicando-se a metodologia estabelecida por Mortensen e Skibsted⁹⁴. Neste contexto, o radical fenoxila foi gerado a partir da irradiação, em comprimento de onda (λ) igual a 355 nm, de uma solução contendo di-*tert*-butil-peróxido (70% v/v) e fenol (ca. 0,1 mol L⁻¹; em acetonitrila), sob atmosfera inerte (Ar) e mantida a 25,0 ± 0,2 °C.

Na avaliação da reatividade dos compostos de interesse (isohumulonas, lupulonas, terpenos e flavonoides prenilados) frente ao radical fenoxila, os estudos cinéticos foram conduzidos ao monitorar as absorções do transiente referente ao radical fenoxila em $\lambda = 390$ nm, empregando-se um espectrofotômetro de transientes - laser flash photolysis (LFP-112 Luzchem) - e usando o terceiro harmônico ($\lambda = 355$ nm) de um laser Brio pulsado de

Nd-YAG Brilhant Easy, com pulsos de 5,2 ns de duração e potencia de 13 mJ cm^{-2} por pulso. As soluções de trabalho foram mantidas a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de Ar, contendo di-*tert*-butil-peróxido (70% v/v), fenol (ca. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila) e diferentes concentrações dos substratos (ca. $1,0 \times 10^{-4}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila). Por fim, as constantes de velocidade da reação entre o radical fenoxila e os substratos foram determinadas através do monitoramento do perfil de decaimento da banda de absorção do transiente (absorção D-D) em condições de pseudo-primeira ordem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reatividade dos compostos de interesse frente o radical HER.

A formação do radical HER foi monitorada através do acompanhamento do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ pela técnica RPE. A partir da análise do espectro de ressonância paramagnética de elétron obtido da mistura reacional, apresentado na **Figura 8**, verifica-se a presença de um triplo dubleto, o qual decorre do acoplamento entre o spin do elétron desemparelhado ($S = 1/2$) com o spin nuclear do átomo de nitrogênio ($I = 1$) e o desdobramento deste tripleto em dubletos pelo acoplamento super hiperfino com o átomo de hidrogênio na posição beta (H_{β}) ($I = 1/2$).

Figura 8 - Espectros de RPE obtidos experimentalmente para a formação do aduto radical com concentrações crescentes de isoxantohumol (mol L^{-1}): (a) $2,6 \cdot 10^{-5}$; (b) $4,4 \cdot 10^{-5}$, (c) $6,2 \cdot 10^{-5}$. As reações foram conduzidas em soluções saturadas de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Do espectro, obteve-se a constante de acoplamento hiperfina entre o elétron desemparelhado e o núcleo do átomo de nitrogênio $a_N = 15,6 \text{ G}$, bem como a constante de acoplamento super hiperfina entre este mesmo elétron com o núcleo do átomo de hidrogênio

$a_{H\beta} = 2,6$ G. Estas constantes de acoplamento e padrão de desdobramento do sinal de RPE estão de acordo com a literatura⁶⁹ e corroboram com a existência do aduto radical [4-POBN/CH(CH₃)OH]•.

A reatividade dos compostos de interesse das lupulonas, terpenos, flavonoides prenilados, tióis e lipídeos frente o radical HER foi obtida pela determinação das constantes de velocidade de segunda ordem das reações de interesse, denominada constante de velocidade aparente (k_{ap}) por se tratar de uma abordagem cinética de competição empregando a armadilha química 4-POBN como competidor.

Desta forma, através da **Equação 1**:

$$\left(\frac{F}{1 - F} \right) * k_2 * [4\text{-POBN}] = k_2' * [\text{SUBSTRATO}] \quad (1)$$

é possível estimar as constantes de velocidade da reação entre o radical HER e os substratos.

Na expressão, (F) representa o percentual de captação do radical pelos substratos, sendo [4-POBN] e [SUBSTRATOS] as concentrações da armadilha química 4-POBN e dos substratos, respectivamente. O termo k_2 representa a constante de velocidade específica da reação entre o radical e a armadilha química 4-POBN, ao passo que k_2' consiste na constante de velocidade aparente (k_{ap}) da reação envolvendo o radical e os substratos. A dedução para a **Equação 1** encontra-se no **Apêndice A**.

Assim, variando-se a concentração dos substratos e monitorando o decréscimo na intensidade do sinal referente ao aduto radical conferido pelo aumento da concentração de substratos nas reações, representado aqui pelo isoxantohumol na **Figura 8**, um gráfico de $(F/F-1)*k_2*[4\text{-POBN}]$ *versus* concentração de substrato foi construído, **Figura 9**. Através do comportamento linear obtido, no qual cada ponto da curva foi resultado da análise em triplicata do sinal do aduto radical para cada concentração utilizada de substrato, determinou-

se a constante de velocidade aparente (k_{ap}) pelo coeficiente angular da reta, conhecendo-se a concentração de 4-POBN empregada e o valor de k_2 ($3,1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁸².

Figura 9 - Gráfico $(F/F-1) \cdot k_2 \cdot [4\text{-POBN}]$ versus concentração de isoxantohumol. Experimentos realizados pela técnica de *spin-trapping* RPE, a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo total de reação de 1 minuto.

4.1.1. Investigação da reatividade das lupulonas frente ao radical HER.

Seguindo a metodologia descrita previamente, determinou-se a constante de velocidade aparente da reação entre as lupulonas e o radical HER, cujo valor obtido para a constante de velocidade foi de $(2,9 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estudos recentes envolvendo a reação entre as isohumulonas e o radical HER têm apontado que a reação é governada preferencialmente pela abstração de átomo de hidrogênio alílico, presente na cadeia lateral prenila, em detrimento à reação de transferência de elétrons⁹⁵. De fato, este efeito pode ser prontamente estendido para a reação envolvendo as lupulonas, uma vez que as estruturas destas apresentam três cadeias laterais prenila.

4.1.1.1. Estudo eletroquímico das lupulonas.

Sabe-se que o cromóforo β -tricarbonílico presente nas estruturas moleculares dos ácidos amargos derivados do lúpulo é suscetível a sofrer oxidação por transferência de elétrons¹¹. Este grupo contém um número significativo de elétrons em orbitais p, deslocalizados em orbitais moleculares de tipo π e compondo um sistema conjugado, o qual é composto por três átomos de oxigênio e quatro átomos de carbono. Desta forma, aparte dos processos oxidativos verificados nas isohumulonas, a degradação destas via transferência de elétrons se deve pela oxidação do grupo β -tricarbonílico¹¹. Este fato pode ser extrapolado para as lupulonas, pois estes compostos apresentam, em sua estrutura química, o cromóforo β -tricarbonílico. No entanto, o potencial de oxidação das lupulonas não foi ainda relatado na literatura.

Assim, o intuito principal do estudo eletroquímico foi determinar o potencial de oxidação das lupulonas. Para tanto, o referido potencial foi obtido utilizando-se o eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho, visto que este eletrodo permite o alcance de altos potenciais positivos, até + 2,8 V *versus* ENH em meio aquoso, sem que se observe a evolução de oxigênio. Foram realizados experimentos de voltametria cíclica em uma janela de potencial de - 0,2 a + 1,6 V *versus* ENH, obtendo voltamogramas em diferentes velocidades de varredura (10, 50, 100 e 200 mV s⁻¹), os quais se encontram ilustrados na **Figura 10**. Neste contexto, verificou-se que o pico de oxidação para as lupulonas foi igual a + 1,1 V *versus* ENH, sendo o voltamograma caracterizado pela presença de um processo irreversível através da ausência da onda de varredura catódica.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos das lupulonas em sua forma molecular, em acetonitrila contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte. Eletrodos: diamante dopado com boro (trabalho), platina (contra-eletrodo), ferroceno (referência interna). As velocidades de varredura foram (mV s^{-1}): (a) = 10, (b) = 50, (c) = 100, (d) = 200.

Também, observou-se que os potenciais de pico deslocam com o aumento da velocidade de varredura. Neste caso, através do gráfico da intensidade da corrente de pico anódico (I) *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), presente na **Figura 10**, constatou-se uma dependência linear, cujo coeficiente linear é igual a 0,9741. Desta forma, foi evidenciado um processo difusional, no qual o transporte de massa na oxidação das lupulonas é controlado cineticamente pela transferência heterogênea de elétrons do substrato para o eletrodo.

Assim, constatou-se que as lupulonas são mais suscetíveis a sofrerem oxidação via transferência de elétron que as isohumulonas, cujos potenciais de oxidação são $+1,4 \text{ V}$ *versus* ENH^{95} para a forma aniônica (desprotonada) e $+1,8 \text{ V}$ *versus* ENH^{95} para a forma molecular (protonada). Ainda, a partir do potencial de oxidação obtido, pode-se inferir que a oxidação do cromóforo β -tricarbônico das lupulonas pelo radical HER por transferência de elétron é termodinamicamente inviabilizada. De fato, verifica-se que o potencial de redução do radical ($E = +0,98 \text{ V}$ *versus* ENH)⁹⁶ é significativamente menor que o potencial de oxidação dos

compostos envolvidos. Logo, constata-se que a reação envolvendo as lupulonas e o radical HER é provavelmente governada pelo processo de oxidação via transferência de átomo de hidrogênio das lupulonas para o radical.

4.1.1.2. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo as lupulonas e o radical HER.

Os produtos da reação entre as lupulonas e o radical HER foram tentativamente identificados por *HPLC-ESI-MSⁿ*, cujo cromatograma de íon total resultante da análise da composição final da reação é apresentado na **Figura 11**. Aqui, pode-se notar que as lupulonas não foram completamente consumidas na reação, sendo o eluato F, em (t_r) 28,8 minutos, referente a eluição da co-lupulona, ao passo que a banda de eluição G refere-se a co-eluição dos homólogos ad- e n-lupulona, em (t_r) 32,0 minutos.

Figura 11 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação das lupulonas e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*ESI-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,7$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (*ESI-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,1$ min (eluato B). (d) Espectro de massas (*ESI-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,1$ min (eluato C). (e) Espectro de massas (*ESI-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,8$ min (eluato D). (f) Espectro de massas (*ESI-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,3$ min (eluato E).

(continua na página 59)

(conclusão da Figura 11)

Ainda, do cromatograma de íons total respectivo à mistura reacional, verificou-se o aparecimento de cinco novas bandas de eluição, então identificadas como A, B, C, D e E. O fragmentograma do eluato A, em (t_r) 18,7 minutos, revelou a presença do íon quasi-molecular $[M+H]^+$ cuja razão m/z foi igual a 417, enquanto que os espectros de massas referentes aos eluatos D e E, em (t_r) 20,8 e 21,3 minutos, respectivamente, revelaram padrões de fragmentação similares, cujo íon quasi-molecular $[M+H]^+$ apresenta razão m/z de 431. Em recentes estudos descritos na literatura, foi reportada a formação de compostos contendo o grupo hidroxila junto à cadeia lateral prenila das isohumulonas, os quais são decorrentes da oxidação destas espécies na presença de espécies radicalares, tais como o radical HER^{1,95}. Nestes estudos, constatou-se ainda que o radical HER abstrai um átomo de hidrogênio alílico da cadeia lateral prenila ou isohexenoíla das isohumulonas, formando, ao final da reação, os derivados hidroxilados⁹⁵.

Analogamente, verifica-se que os íons quasi-molecular $[M+H]^+$ cuja razão m/z foi igual a 417 e 431 são referentes à molécula do análogo co-lupulona e dos homólogos ad- e n-lupulona contendo o grupo hidroxila adicionado, respectivamente. Por outro lado, do espectro de massas referentes aos eluatos B e C, em (t_r) 19,1 e 20,1 minutos, respectivamente, verifica-se padrões de fragmentação similares, cujo íon quasi-molecular $[M+H]^+$ identificado apresenta razão m/z de 461. A partir da análise dos espectros obtidos, estes sugerem a adição do radical HER à molécula dos homólogos ad- e n-lupulonas.

Para confirmar esta suposição, a reação foi então processada em meio deuterado (etanol- d_6) e a mistura reacional foi analisada por *HPLC-ESI-MSⁿ*, cujo cromatograma de íons total encontra-se na **Figura 12**. Desta forma, verificou-se um perfil cromatográfico similar ao obtido quando a reação foi conduzida em etanol, bem como os espectros de massas referentes eluatos A, D e E, **Figura 11**. Por outro lado, observa-se a presença do íon quasi-molecular $[M+H]^+$ 465 m/z nos fragmentogramas obtidos a partir das bandas de eluição B e C, o qual

apresenta quatro unidades de massa adicionais ao íon quasi-molecular ($[M+H]^+ = 461 \text{ m/z}$) dos respectivos picos decorrentes da reação conduzida em etanol, **Figura 11**.

Figura 12 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica deuterada (etanol- d_6) contendo os produtos decorrentes da reação das lupulonas e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas ($ESI-(+)-MS$) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,7$ min (eluato A). (c) Espectro de massas ($ESI-(+)-MS$) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,1$ min (eluato B). (d) Espectro de massas ($ESI-(+)-MS$) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,1$ min (eluato C). (e) Espectro de massas ($ESI-(+)-MS$) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,8$ min (eluato D). (f) Espectro de massas ($ESI-(+)-MS$) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,3$ min (eluato E).

(continua na página 62)

(conclusão da Figura 12)

De fato, estes os dados corroboram com a confirmação das estruturas químicas inerentes aos eluatos B e C, cujo íon quasi-molecular $[M+H]^+$ apresenta a razão m/z de 461, **Figura 11**. Assim, pode-se inferir que, como produto da reação estudada, tem-se também a formação de compostos contendo uma molécula do radical HER adicionada à cadeia lateral prenila das lupulonas.

Em um estudo abordando a reação das isohumulonas frente ao radical HER, foi reportado que a *BDE* da ligação C-H referente ao átomo de hidrogênio alílico contido na cadeia lateral prenila das isohumulonas é igual a 316 kJ mol^{-1} , indicando a possível abstração do referido átomo de hidrogênio pela espécie radicalar⁹⁵. Este fato pode ser estendido para as

lupulonas, uma vez que as estruturas destes compostos apresentam três cadeias laterais prenila. Neste contexto, efetuou-se o cálculo das *BDEs* das ligações C-H indicadas na **Figura 13**, cujos valores são 317 kJ mol^{-1} ($\text{C-H}_{\text{pren}(1)}$), 342 kJ mol^{-1} ($\text{C-H}_{\text{pren}(2)}$) e 330 kJ mol^{-1} ($\text{C-H}_{\text{pren}(3)}$). Através dos valores de entalpia de dissociação das ligações supracitadas, pode-se inferir que a abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico, presente na cadeia lateral $\text{C-H}_{\text{pren}(1)}$, é preferencial em detrimento à transferência dos átomos de hidrogênio alílicos contidos nas demais cadeias laterais, $\text{C-H}_{\text{pren}(2)}$ e $\text{C-H}_{\text{pren}(3)}$.

Figura 13 - Representação das possíveis ligações C-H envolvidas na abstração do átomo de hidrogênio das lupulonas pelo radical HER.

Logo, a partir deste conjunto de dados, propôs-se o mecanismo da reação envolvendo as lupulonas e o radical HER, o qual se encontra ilustrado no **Esquema 9**. Neste contexto, a reação inicia-se pela abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico presente no grupo prenila das lupulonas. Esta abstração se dá pelo radical HER, resultando na formação de um radical terciário estabilizado por ressonância. Existem, no entanto, três caminhos pelos quais a reação pode seguir a partir da formação do radical terciário. Os caminhos 1 e 2 foram previamente relatados na literatura e sintetizam a reação entre o radical HER e as isohumulonas⁶³. Analogamente, estas duas vias reacionais podem ser aplicadas para descrever a formação dos derivados das lupulonas contendo o grupo hidroxila adicionado à sua cadeia lateral.

Esquema 9 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre as lupulonas e o radical HER.

O caminho 1 resume a reação do radical terciário com o oxigênio molecular. Sabe-se que a concentração de oxigênio residual dissolvido na cerveja (garrafa) gira em torno de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ⁷², o qual é responsável por causar diversas reações de degradação da bebida durante a sua estocagem. Desta forma, o oxigênio molecular (triplete) reage com o radical terciário supracitado gerando o radical peroxila, o qual posteriormente abstrai um átomo de hidrogênio do meio reacional, culminando na formação dos hidroperóxidos. Ainda, a presença de traços de íons metálicos, tais como Fe(II), conduz a clivagem dos grupos hidroperóxidos^{1,95} e, após a abstração de mais um átomo de hidrogênio do meio reacional, os hidróxidos são formados (compostos (b *i-iii*), **Esquema 9**).

O caminho reacional 2, sintetiza a reação entre o radical hidroxila, gerado constantemente na solução, e o radical terciário derivado das lupulonas. Como resultado, temos a formação direta dos hidróxidos identificados (compostos (b *i-iii*), **Esquema 9**). Este mecanismo é suportado pelo fato da constante de velocidade da reação entre os radicais supracitados ser próxima ao limite da difusão em meio aquoso (i.e. $\sim 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Por fim, o caminho 3 descreve a terminação radicalar promovida pela reação entre o radical HER e o radical terciário derivado das lupulonas, resultando na formação dos compostos contendo o radical adicionado na cadeia lateral das lupulonas (compostos (c *i-iii*), **Esquema 9**). Logo, tem-se como resultado que a constante de velocidade aparente obtida para a reação envolvendo as lupulonas e o radical HER é resultante da somatória das constantes de velocidade das reações que envolvem o radical supracitado, as quais estão indicadas no **Esquema 9** como k_1 e k_2 .

A título de confirmação do mecanismo de reação proposto, os produtos da reação em estudo foram qualitativamente identificados por espectrometria de massas exata de ultra-alta resolução (*HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*) pela infusão direta da mistura reacional. Desta forma, a partir dos espectros de massas apresentado no **Apêndice B**, os compostos (b *i-iii*) do

Esquema 9 foram identificados pela presença dos íons quasi-moleculares $[M + H]^+$ 417,26317 m/z (compostos (b i), **Esquema 9**, erro de $-0,9$ ppm calculado para $[C_{25}H_{36}O_5 + H]^+ = 417,26355$) e 431,27886 m/z (compostos (b ii-iii), **Esquema 9**, erro de $-0,8$ ppm calculado para $[C_{26}H_{38}O_5 + H]^+ = 431,27920$). Analogamente, os compostos (c i-iii) do **Esquema 9** foram identificados pela presença dos íons quasi-moleculares $[M + H]^+$ 445,29446 m/z (compostos (c i), **Esquema 9**, erro de $-0,9$ ppm calculado para $[C_{27}H_{40}O_5 + H]^+ = 445,29485$), e 459,310212 e 461,32579 m/z (compostos (c ii-iii), **Esquema 9**, erro de $-0,8$ ppm calculado para $[C_{28}H_{42}O_5 + H]^+ = 459,3105$ e $[C_{28}H_{44}O_5 + H]^+ = 461,32615$).

Como um todo, os resultados aqui apresentados corroboram com o mecanismo de reação proposto no **Esquema 9**.

4.1.2. Investigação da reatividade dos terpenos frente ao radical HER.

Análogo às lupulonas, reatividade dos terpenos, cujas estruturas químicas estão apresentadas nas **Figuras 3**, foi determinada. As constantes de velocidade aparentes obtidas para as reações aqui inseridas estão reportadas na **Tabela 1**. Conforme pode ser observado da análise das constantes de velocidades aparentes obtidas, os terpenos apresentam reatividades distintas, fato este conectado possivelmente à presença de diferentes sítios reacionais contidos nas moléculas dos terpenos.

Tabela 1 - Constantes de velocidade aparentes de reação entre o radical HER e terpenos determinadas por *spin-trapping* RPE, em 1 minuto de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C.

Substratos	k_{ap} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
α -Pineno	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^5$
β -Pineno	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^5$
Limoneno	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^6$
Terpinoleno	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^7$
β -Mirceno	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^6$
α -Humuleno	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^7$
β -Cariofileno	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^6$
β -Farneseno	$(5,4 \pm 0,1) \times 10^6$
Cimeno	$(5,4 \pm 0,1) \times 10^5$
1,8-Cineole	N.R.*
β -Citronelol	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^5$
Geraniol	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^6$
Nerol	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^6$
Linalol	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^5$
α -Terpineol	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^5$
α -Eugenol	$(6,8 \pm 0,3) \times 10^6$
Carvacrol	$(5,5 \pm 0,3) \times 10^5$
Timol	$(5,3 \pm 0,1) \times 10^5$
Nerolidol	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^6$

* N.R.: Não Reativo.

Alguns estudos recentes apontaram que as reações de oxidação de terpenos promovidas pela presença de espécies radicalares são preferencialmente governadas via abstração de átomos de hidrogênio alílicos e (bis)alílicos presentes nas estruturas dos terpenos^{25,32}. Este fato pode ser sustentado no presente trabalho, uma vez que não foi observada reatividade do radical HER com o 1,8-cineole, o qual não apresenta insaturação em sua estrutura.

Ainda, ao comparar a constante de velocidade aparente de um terpeno alceno com a obtida para um terpeno álcool contendo o mesmo número de átomos de hidrogênio alílicos, como, por exemplo, o α -pineno e o β -citronelol, respectivamente, constata-se que estes compostos apresentam a mesma reatividade frente ao radical, uma vez que as constantes de velocidade aparentes obtidas para ambos os compostos são estatisticamente iguais ($p = 0,05$). Desta forma, pôde-se inferir que o grupo funcional hidroxila, presente nos terpenos álcoois,

não representa o sítio reacional envolvido na reação em estudo, sendo, portanto, o mecanismo da reação governado pela abstração de átomos de hidrogênio alílicos e (bis)alílicos dos terpenos pelo radical HER. Logo, de acordo com o mecanismo da reação proposto, aqui representado para o α -pineno e β -citronelol, **Esquemas 10 e 11**, respectivamente, verifica-se que as constantes de velocidade aparentes obtidas para ambos os compostos são resultantes da somatória de três constates (k_1 , k_2 e k_3) decorrentes de três caminhos reacionais.

Esquema 10 - Ilustração da formação dos possíveis radicais durante a reação entre o α -pineno e o radical HER.

Esquema 11 - Ilustração da formação dos possíveis radicais durante a reação entre o β -citronelol e o radical HER.

Constatou-se ainda uma maior reatividade por parte dos terpenos que contêm átomos de hidrogênio (bis)alílicos em suas estruturas, tais como o terpinoleno e o α -humuleno, cujas constantes de velocidade obtidas são na ordem de $10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De fato, o valor verificado para a *BDE* da ligação C-H envolvendo o hidrogênio (bis)alílico do terpinoleno (302 kJ mol^{-1}) foi significativamente menor que os valores obtidos para os outros átomos de hidrogênios alílicos do composto (de 318 a 323 kJ mol^{-1}), refletindo assim o favorecimento na abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico do terpinoleno pelo radical HER em detrimento à abstração dos respectivos átomos de hidrogênios alílicos.

A partir do conjunto de dados aqui inseridos, pôde-se inferir que a constante de velocidade está diretamente relacionada com o número de átomos de hidrogênios alílicos e (bis)alílicos presentes nas estruturas moleculares dos terpenos. Tal constatação é sustentada ao se comparar a constante de velocidade obtida para terpenos de mesma função orgânica, como, por exemplo, os terpenos álcoois geraniol e β -citronelol, os quais, por apresentarem diferentes números de átomos de hidrogênio alílicos, exibiram reatividades distintas. Assim, verifica-se que quanto maior número de átomos de hidrogênio alílicos e (bis)alílicos presentes na estrutura molecular do terpeno, maior será a extensão da reação de oxidação promovida pelo radical HER.

4.1.2.1. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os terpenos e o radical HER.

Os produtos decorrentes da oxidação dos terpenos mediante a presença do radical HER foram tentativamente identificados através da técnica *UPLC-APCI-LTQ Orbitrap FT-MS*, cujo cromatograma obtido é ilustrado na **Figura 14 (a)**.

Figura 14 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do terpinoleno e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*APCI*-(+)-*MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,0$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (*APCI*-(+)-*MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 9,0 - 11,4$ min (eluato B).

Do cromatograma de íons total e fragmentogramas obtidos, constatou-se que o eluato B, em (t_r) 20,0 minutos, é referente ao terpinoleno remanescente da reação, cujo íon quasi-molecular $[M + H]^+$ apresenta a razão m/z de 137,2423 (erro de 2,2 ppm calculado para a fórmula $[C_{10}H_{16} + H]^+ = 137,2420$ m/z), **Figura 14 (c)**. Os eluatos contidos na região

denominada por A no cromatograma, em (t_r) de 9,0 a 11,4 minutos, referem-se aos produtos de oxidação do terpinoleno formados. Conforme pode ser notado, não foi possível obter uma separação analítica adequada dos produtos. Porém, pela análise dos fragmentogramas obtidos a partir destes analitos, observou-se um mesmo padrão de fragmentação, aqui representado pelo espectro de massas apresentado na **Figura 14 (b)**.

Ainda, padrões de fragmentogramas similares foram obtidos para os produtos de oxidação formados e para o terpinoleno, precursor da reação, conforme apresentado na **Figura 14 (b) e (c)**. De fato, o íon base (137,2416 m/z) do espectro de massas decorrente da análise dos produtos da reação, **Figura 14 (b)**, consiste no íon fragmento formado a partir da perda de uma molécula de água do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ cuja razão m/z é igual a 155,2566, o qual não foi detectado no referido espectro de massas. Vale ressaltar que a mesma perda de massa foi verificada nos espectros de massas obtidos nas análises dos padrões de terpeno álcoois. Desta forma, a partir da análise dos produtos de oxidação dos terpenos gerados pela presença do radical HER, verificou-se a formação de isômeros contendo um grupo hidroxila ligado à molécula do precursor inicial. O mesmo comportamento foi verificado tanto para os terpenos alcenos como para os terpenos álcoois aqui investigados.

A partir da diferença nas reatividades apresentadas pelos terpenos frente ao radical HER, somada à caracterização dos produtos da reação, o mecanismo da reação foi proposto para o terpinoleno, conforme ilustrado no **Esquema 12**. Neste contexto, a reação é iniciada pela abstração dos átomos de hidrogênio alílicos e (bis)alílico da molécula do terpinoleno pelo radical HER, gerando diversas espécies radicalares ressonantes. Estes radicais primários e secundários, formados inicialmente, culminam na formação de radicais terciários estabilizados por ressonância. Desta forma, tem-se, como intermediários da reação, a coexistência de radicais primários, secundários e terciários.

Esquema 12 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o terpinoleno e o radical HER.

Análogo ao exposto para o mecanismo envolvendo o radical HER e as lupulonas, a reação pode seguir por dois caminhos reacionais para descrever a formação dos hidróxidos derivados dos terpenos. O caminho 1 sintetiza as reações envolvendo os radicais intermediários com o oxigênio molecular (O_2), o qual é encontrado em concentrações apreciáveis na cerveja⁷². Logo, pela reação do oxigênio com os radicais, tem-se a geração dos radicais peroxila que abstraem prontamente átomos de hidrogênio do meio reacional, culminando na formação dos hidroperóxidos. Sabe-se que a presença de íons metálicos de Fe(II) conduzem à clivagem dos grupos hidroperóxidos derivados dos terpenos⁹⁷. Logo, pela clivagem dos hidroperóxidos, seguida da abstração do átomo de hidrogênio do meio reacional, são formados os hidróxidos identificados (compostos (b) – (n), **Esquema 12**).

A segunda via reacional consiste na reação direta entre o radical hidroxila e os radicais intermediários gerados inicialmente no processo, culminando na formação dos hidróxidos (compostos (b) a (n), **Esquema 12**). Como resultado, tem-se que a constante de velocidade global da reação envolvendo o terpinoleno e o radical HER é resultante da somatória das constantes de velocidade referentes às diversas reações de abstração dos átomos de hidrogênio do substrato pelo radical (indicadas no **Esquema 12** como k_1 a k_6). Contudo, é esperado uma maior contribuição para a constante de velocidade global por parte da constante inerente à reação envolvendo o átomo de hidrogênio (bis)alílico (k_6), uma vez que esta ligação C-H apresenta um valor de *BDE* relativamente menor quando comparada às ligações C-H abrangendo os átomos de hidrogênio alílicos.

Ao analisar a estabilidade química dos radicais intermediários gerados durante o processo de oxidação supracitado, pode-se inferir que as espécies majoritárias formadas e identificadas ao final da reação são os hidróxidos advindos dos radicais terciários. Ainda, pela avaliação das estruturas dos produtos identificados, verifica-se que estes podem sofrer reações de oxidação subsequentes e assim estender o processo de deterioração seguindo o mesmo

mecanismo relatado, e contribuindo, desta forma, na somatória das constantes de velocidade para a reação. No entanto, estes diferentes poli-hidróxidos, contendo dois ou mais grupos hidroxilas ligados à molécula do terpeno precursor, não foram identificados, o que possivelmente está relacionado a fatores cinéticos envolvidos nas reações subsequentes; ou seja, o tempo de reação aplicado antes de efetuar as análises pode não ter sido suficiente para que tais compostos tenham sido gerados em concentrações apreciáveis, necessárias para a sua detecção.

4.1.3. Estudo da reatividade dos flavonoides prenilados frente ao radical HER.

A partir das constantes de velocidade aparentes obtidas para a reação envolvendo os flavonoides prenilados e o radical HER, apresentadas na **Tabela 2**, verificou-se que as constantes de velocidade, da ordem de $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, estão próximas ao limite da difusão em meio aquoso, no qual as constantes de velocidade são da ordem de $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo o encontro das espécies em solução suficiente para que a reação se processe. Ainda, mediante a leitura das constantes de velocidade obtidas, verifica-se que o xantohumol ($k_{ap} = (3,6 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) consiste na espécie mais reativa frente ao radical HER dentre os flavonoides prenilados aqui investigados, sendo os valores das constantes obtidas para a reação envolvendo as flavanonas isoxantohumol ($k_{ap} = (1,8 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 6-prenilnaringenina ($k_{ap} = (1,5 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e 8-prenilnaringenina ($k_{ap} = (1,7 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) estatisticamente iguais ($p = 0,05$).

Tabela 2 - Constantes de velocidade aparentes para a reação entre o radical HER e flavonoides prenilados determinadas por *spin-trapping* RPE, em 1 minuto de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Substratos	$k_{ap} (\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Xantohumol	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^9$
Isoxantohumol	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^9$
6-Prenilnaringenina	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^9$
8-Prenilnaringenina	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^9$

Marfak e colaboradores⁷³ estudaram a reatividade de flavonoides, tais como algumas flavanonas, flavonas e catequinas, frente ao radical HER através de experimentos de radiólise de pulso com detecção de absorção de transientes. Neste trabalho, os autores verificaram que alguns flavonoides, como a quercetina, **Figura 15 (a)**, mostraram-se reativos frente ao radical HER, ao passo que certos flavonoides, como a naringenina, **Figura 15 (b)**, não o são. De fato, a degradação de flavonoides pela presença do radical HER está diretamente relacionada com a presença do grupo hidroxila na posição 3-OH e à dupla ligação C=C adjacente, **Figura 15 (a)**. Logo, o mecanismo para a reação supracitada foi proposto por iniciar-se pela reação de abstração do átomo hidrogênio do grupo hidroxila (3-OH) pelo radical HER.

Figura 15 - Representação das estruturas químicas da (a) quercetina, (b) naringenina.

Analogamente, pôde-se inferir que um possível e único sítio reacional dos flavonoides isoxantohumol, 6- e 8-prenilnaringenina consiste no átomo de hidrogênio (bis)alílico da ligação C-H contida na cadeia lateral prenila, uma vez que as estruturas químicas da 6- e 8-prenilnaringenina diferem da molécula da naringenina somente pela presença da cadeia lateral. Por outro lado, a molécula do xantohumol apresenta um provável segundo sítio de reação adicional em sua estrutura química, uma vez que a constante de velocidade aparente obtida para este substrato é praticamente o dobro das constantes de velocidade determinadas para os demais polifenóis prenilados.

4.1.3.1. Cálculos quânticos das moléculas dos flavonoides prenilados.

Para um maior entendimento do mecanismo envolvido neste tipo de reação, principalmente no que se refere à diferença de reatividade verificada entre os xantohumol e demais flavonoides prenilados aqui inseridos, efetuou-se cálculos quânticos *ab initio* com as estruturas químicas dos compostos supracitados com o intuito de determinar as propriedades eletrônicas e estruturais dos mesmos. Desta forma, os dados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Propriedades eletrônicas dos flavonoides prenilados calculadas usando o método *DFT* e a base 6-311++g(2d,2p).

		Xantoh.	Isoxantoh.	6-Prenilnaring.	8-Prenilnaring.
E_{HOMO} (eV)		- 6,2	- 6,2	- 6,3	- 6,3
E_{LUMO} (eV)		- 2,6	- 1,8	- 2,1	- 2,1
PI^{**} (kJ mol ⁻¹)		551	563	574	568
Entalpia de Dissociação da Ligações (BDE) (kJ mol ⁻¹)	C-H _{pren}	307	308	313	309
	O-H _(2')	380	---	---	---
	O-H ₍₄₎	336	---	---	---
	O-H ₍₇₎	---	352	362	361
	O-H ₍₅₎	---	---	379	382
	O-H _(4')	367	336	347	348

Adicionalmente, a **Figura 16** apresenta as configurações espaciais mais estáveis para as moléculas do xantohumol (**a**) e isoxantohumol (**b**), bem como os respectivos orbitais moleculares de fronteira de maior energia ocupado (*HOMO*) e de menor energia desocupado (*LUMO*). Vale ressaltar que as configurações espaciais para as demais flavanonas, 6- e 8-prenilnaringenina, bem como as respectivas superfícies de contorno de orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* são similares às apresentadas pelo isoxantohumol, sendo, portanto, este o representante desta classe de compostos.

^{**} PI: Potencial de Ionização.

Figura 16 - Representação das configurações espaciais e das superfícies de contorno dos orbitais moleculares de fronteira desocupado de menor energia (*LUMO*) e ocupado de maior energia (*HOMO*) calculadas para os (a) xantohumulol e (b) isoxantohumulol.

Da análise das superfícies de contorno dos orbitais moleculares *HOMO* para as estruturas e geometrias otimizadas do xantohumulol e isoxantohumulol, verifica-se praticamente uma contribuição dos mesmos átomos para o orbital *HOMO*, estando estes localizados majoritariamente sobre o anel aromático adjacente à cadeia lateral prenila. Ainda, avaliando os valores obtidos para as energias destes orbitais, constata-se que estes não diferem entre si de forma significativa e, consequentemente, não explicam a diferença na reatividade

verificada para a reação envolvendo o xantohumol quando comparada com a reatividade obtida para os demais compostos da série. O mesmo feito também não é justificado ao analisar os valores dos potenciais de ionização (PI) dos substratos aqui inseridos, pois estes apresentam praticamente o mesmo PI. Assim, pode-se inferir que a reação entre os flavonoides prenilados e o radical HER provavelmente não é governada via transferência de elétron.

Outro parâmetro que inviabiliza a transferência de elétron das moléculas dos flavonoides prenilados para o radical HER consiste na comparação entre os valores de PI obtidos para os substratos com os respectivos valores de *BDEs* das ligações C-H_{pren} e O-H destacadas na **Figura 17**. De fato, os valores de PI são pelo menos 169 kJ mol⁻¹ maiores que os valores das *BDEs*, refletindo assim o não favorecimento da reação de transferência de elétron frente à reação de abstração de átomo de hidrogênio.

Figura 17 - Representação das possíveis ligações C-H e O-H envolvidas na abstração do átomo de hidrogênio dos flavonoides prenilados pelo radical HER. (a) xantohumol; (b) isoxantohumol; (c) 6-prenilnaringenina; (d) 8-prenilnaringenina.

Pela leitura das *BDEs* obtidas para as ligações C-H_{pren} e O-H, **Tabela 3**, constata-se que a ligação C-H_{pren} apresenta um menor valor de entalpia de dissociação quando comparada

com as entalpias associadas à dissociação das ligações O-H. Ainda, ao considerar as possíveis ligações de hidrogênio que os grupos hidroxila estão suscetíveis a fazerem com o meio reacional (etanol), verifica-se que, de fato, os átomos de hidrogênios dos referidos grupos ficam menos acessíveis à abstração pelo radical. Desta maneira, a abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico pertencente à cadeia lateral prenila é mais favorável que a abstração dos átomos de hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxilas, sendo este um forte indício de que a reação em estudo seja governada pela abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico da prenila. Contudo, os valores de *BDEs* das ligações C-H_{pren} ainda não esclarecem a diferença na reatividade observada para o xantohumol frente às flavanonas isoxantohumol, 6- e 8-prenilnaringenina, uma vez que estes dados não diferem significativamente entre si.

Comparando os valores obtidos para as energias dos orbitais moleculares de fronteira *HOMO* e *LUMO* dos flavonoides prenilados com a energia verificada para o orbital *SOMO* do radical HER, **Figura 18**, verifica-se praticamente um mesmo intervalo de energia (ΔE) entre os orbitais *HOMO* dos flavonoides prenilados com relação ao orbital *SOMO* do radical. Por outro lado, a energia do orbital *LUMO* do xantohumol (- 2,6 eV) é a que mais se aproxima da energia do referido orbital do radical (- 4,5 eV), cuja diferença energética é de 183 kJ mol⁻¹, sendo este intervalo (ΔE) significativamente maior para os demais flavonoides analisados (260 kJ mol⁻¹ para o isoxantohumol e 232 kJ mol⁻¹ para a 6- e 8-prenilnaringenina).

Figura 18 - Diagrama de energia dos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* dos flavonoides prenilados e do orbital de fronteira *SOMO* do radical HER.

A partir da escala energética apresentada na **Figura 18**, constata-se praticamente um mesmo intervalo de energia entre os orbitais *SOMO-HOMO* e *SOMO-LUMO* do radical HER e do xantohumol, respectivamente, podendo, portanto, haver tanto uma reação de adição nucleofílica quanto uma reação de adição eletrofílica por parte do radical à molécula do xantohumol. No entanto, ao analisar as superfícies de contorno obtidas para os orbitais moleculares de fronteira *LUMO* do xantohumol e isoxantohumol, **Figura 16**, constata-se que, apesar de ambos apresentam caráter antiligante (π^*), estes se encontram localizados em regiões distintas nas moléculas. De fato, uma maior contribuição para o orbital *LUMO* situa-se sobre os átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio contidos no grupo carbonila α,β -insaturada para a molécula do xantohumol, ao passo que para a molécula do isoxantohumol e demais flavanonas os referidos orbitais de fronteira estão centrados majoritariamente sobre os átomos pertencentes aos anéis A, B e C dos compostos.

Logo, a partir dos dados apresentados, pode-se inferir que a presença da carbonila α,β -insaturada na molécula do xantohumol pode resultar em um sítio de reação adicional, uma vez que os orbitais de fronteira envolvidos na reação em questão (*LUMO* do xantohumol e

SOMO do radical) apresentam energias e simetrias compatíveis para que a reação se processo, pois ambos os orbitais exibem caráter π . Neste contexto, o sistema conjugado composto pela carbonila e pela dupla ligação adjacente atua como um eficiente grupo atraente de elétrons, no qual a interação entre os orbitais *SOMO-LUMO* do radical e do xantohumol, respectivamente, é facilitada pela aproximação energética entre os orbitais supracitados. Esta interação faz o radical HER comportar-se como um bom nucleófilo, culminando na reação de adição deste à carbonila α,β -insaturada da molécula do xantohumol e assim ocasionando um aumento na velocidade da reação expresso pela constante de velocidade aparente obtida.

4.1.3.2. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os flavonoides prenilados e o radical HER.

Os produtos decorrentes da reação entre os flavonoides prenilados e o radical HER foram tentativamente identificados empregando-se como substratos o xantohumol e isoxantohumol. Neste contexto, as misturas reacionais foram analisadas pela técnica *UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*, cujos cromatogramas obtidos estão representado nas **Figuras 19 e 21**.

Figura 19 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do xantohumulol e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,2$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,0$ min (eluato B). (d) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 21,7$ min (eluato C). (e) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 23,0$ min (eluato D).

(continua na página 83)

(conclusão da Figura 19)

Do cromatograma de íons total resultante da análise da mistura reacional contendo o xantohumol e radical HER, **Figura 19 (a)**, constata-se que o flavonoide não foi completamente consumido na reação, sendo o eluato D, em (t_r) 23,0 minutos, referente à eluição do xantohumol, cujo íon quasi-molecular [M - H]⁻ apresenta a razão m/z de 353,3886 (erro de 0,6 ppm calculado para [C₂₁H₂₂O₅ - H]⁻ = 353,3884 m/z). Os eluatos A, B e C referem-se aos produtos da reação aqui inserida, cujos (t_r) são 18,2, 21,0 e 21,7 minutos, respectivamente. O espectro de massas da banda de eluição A, **Figura 19 (b)**, revelou a presença do íon quasi-molecular [M - H]⁻ cuja razão m/z é igual a 441,4944 (erro de 2,0 ppm calculado para [C₂₅H₃₀O₇ - H]⁻ = 441,4935 m/z), o qual foi relacionado com a formação de um composto contendo duas moléculas do radical HER ligadas à molécula do xantohumol.

Por outro lado, verificou-se a formação de dois isômeros contendo uma molécula do radical adicionada à estrutura do substrato, cujos íons quasi-moleculares [M - H]⁻

apresentaram razões m/z iguais a 397,4417 (erro de 1,8 ppm calculado para $[C_{23}H_{26}O_6 - H]^- = 397,4410$ m/z ; eluato B), **Figura 19 (c)**, e 397,4415 (erro de 1,2 ppm calculado para $[C_{23}H_{26}O_6 - H]^- = 397,4410$ m/z ; eluato C), **Figura 19 (d)**. A partir dos produtos da reação obtidos, e somando-se o conjunto de informações eletrônicas e estruturais do xantohumol descritas anteriormente, o mecanismo da reação envolvendo o xantohumol e o radical HER foi elucidado, o qual se encontra ilustrado no **Esquema 13**.

Neste contexto, a reação segue por dois caminhos. Na primeira via reacional, a reação é iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio (bis)alílico pertencente à cadeia lateral prenila do xantohumol (composto (a), **Esquema 13**). De fato, esta abstração é realizada pelo radical HER, culminando na formação de um radical secundário, o qual é rapidamente convertido a um radical terciário estabilizado por ressonância. Este radical terciário reage por recombinação radical com o radical HER, formando assim um derivado do xantohumol contendo uma molécula do radical ligada à sua estrutura (composto (b), **Esquema 13**). A este produto é adicionada uma segunda molécula do radical HER através de uma 1,4-adição conjugada na carbonila α,β -insaturada, resultando na formação do radical alcóxila, o qual é prontamente reduzido pelos íons de Fe(II) presentes no meio reacional, formando, ao final desta via, o derivado do xantohumol contendo duas moléculas do radical HER adicionadas (composto (c), **Esquema 13**).

The diagram illustrates the reaction mechanism for the oxidation of a substituted phenol by hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$). The reaction proceeds via two main pathways, labeled "caminho 1" and "caminho 2".

Initial Substrate: A substituted phenol with a hydroxyl group at the 4-position, a methoxy group at the 3-position, and a side chain at the 1-position containing a double bond and a carbonyl group.

Pathway 1 (Left):

- The hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) adds to the carbonyl carbon of the side chain (rate constant k_1).
- This forms a radical intermediate (labeled (a)).
- Resonance structures of this intermediate are shown.
- The intermediate can be oxidized to a ketone (labeled (b)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_2).
- Alternatively, the intermediate can be oxidized to a ketone (labeled (d)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_4).
- The ketone (d) is then oxidized to a ketone (labeled (c)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_5).

Pathway 2 (Right):

- The hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) adds to the carbonyl oxygen of the side chain (rate constant k_3).
- This forms a radical intermediate (labeled (b)).
- Resonance structures of this intermediate are shown.
- The intermediate can be oxidized to a ketone (labeled (b)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_2).
- Alternatively, the intermediate can be oxidized to a ketone (labeled (d)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_4).
- The ketone (d) is then oxidized to a ketone (labeled (c)) via a reaction with $\cdot\text{OH}$ (rate constant k_5).

Final Products: The reaction leads to the formation of a ketone (labeled (b)) and a ketone (labeled (c)).

O outro caminho de reação inicia-se pela formação do outro isômero que contem uma molécula do radical HER ligada à molécula do xantohumol (composto (d), **Esquema 13**), o qual é gerado a partir da 1,4-adição conjugada do radical à carbonila α,β -insaturada do substrato, seguido da redução do radical alcóxila pelos íons metálicos de Fe(II). Análogo à iniciação da primeira via reacional, a segunda molécula do radical HER é adicionada ao isômero intermediário (composto (c), **Esquema 13**) através da abstração do átomo de hidrogênio presente na cadeia lateral prenila e posterior recombinação do radical terciário com outra molécula do radical HER.

Como resultado, tem-se que a constante de velocidade aparente obtida para a reação envolvendo o xantohumol e o radical HER é decorrente da somatória das constantes de velocidade das reações sucessivas que envolvem o radical, as quais estão indicadas no **Esquema 13** como k_1 a k_6 . No entanto, uma maior contribuição para a constante de velocidade global da reação é esperada por parte das constantes de velocidade inerentes aos processos envolvendo a recombinação entre radicais e a abstração de átomo de hidrogênio, uma vez que a constante de velocidade aparente obtida na abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico pertencente à cadeia lateral prenila das lupulonas é da ordem de $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁹⁵.

A constante de velocidade para a reação envolvendo o radical HER e o grupo carbonila α,β -insaturada foi obtida empregando-se como substrato o cinamaldeído, cuja estrutura química encontra-se representada na **Figura 20 (a)**. Neste contexto, verificou-se uma constante de velocidade aparente igual a $(7,4 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a qual decorre da reação de 1,4-adição conjugada do radical HER ao grupo carbonila α,β -insaturada. Adicionalmente a este fato, encontra-se reportado na literatura a constante de velocidade aparente da reação entre o radical em estudo e o ácido p-coumárico, **Figura 20 (b)**, cujo valor é igual a $1,0 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁹⁵.

Figura 20 - Representação das estruturas químicas do (a) cinamaldeído e (b) ácido p-coumárico.

Logo, a partir do conjunto de dados apresentados, pode-se inferir que a magnitude da constante de velocidade inerente a reação de adição do radical HER à carbonila α,β -insaturada, indicada no **Esquema 13** como k_3 e k_4 , é igual a $10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como consequência, tem-se que a constante de velocidade aparente obtida para a reação envolvendo o xantohumol e o radical HER é fruto da somatória das constantes k_1 e k_5 , resultantes da abstração de átomos de hidrogênio do substrato, e k_2 e k_6 , as quais são decorrentes da recombinação entre radicais, conforme indicado no mecanismo proposto.

Através da apreciação do cromatograma de íons total decorrente da análise da mistura reacional contendo o isoxantohumol e o radical HER, observa-se a presença de apenas duas bandas de eluição, indicados na **Figura 21** como eluatos A e B. O eluato B, em (t_r) 18,6 minutos, refere-se à eluição do substrato isoxantohumol, cujo íon quasi-molecular $[M - H]^-$ apresenta a razão m/z de 353,3891 (erro de 2,0 ppm calculado para $[C_{21}H_{22}O_5 - H]^- = 353,3884 \text{ m/z}$). Por outro lado, o espectro de massas do eluato A, em (t_r) 16,0 minutos, revelou a presença do íon quasi-molecular $[M - H]^-$ cujas razão m/z é igual a 397,4421 (erro de 2,8 ppm calculado para $[C_{23}H_{26}O_6 - H]^- = 397,4410 \text{ m/z}$), o qual foi relacionado com a formação do produto contendo uma molécula do radical HER ligada à estrutura química do isoxantohumol.

Figura 21 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do isoxantohumol e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 16,0$ min (eluato A). (c) Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 18,6$ min (eluato B).

Vale ressaltar que os cromatogramas e padrões dos espectros de massas obtidos nas análises das misturas reacionais contendo a 6- e 8-prenilnaringenina como substratos foram similares ao apresentado pelo isoxantohumol, uma vez que estes compostos apresentam estruturas químicas similares e, portanto, reatividades similares. Logo, diante dos dados

coletados, propôs-se o mecanismo para a reação envolvendo o radical HER e as flavanonas preniladas, aqui representadas pelo isoxantohumol no **Esquema 14**.

Análogo ao caminho 1 descrito para a reação envolvendo o xantohumol, **Esquema 13**, a degradação do isoxantohumol (composto (a), **Esquema 14**) inicia-se pela abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico pertencente à cadeia lateral prenil, culminando na formação de um radical terciário estabilizado por ressonância. O radical terciário, por sua vez, recombina prontamente com outra molécula do radical HER para formar o produto final contendo uma molécula do radical ligada à molécula do precursor da reação (composto (b), **Esquema 14**). Desta forma, verifica-se que para as flavanonas preniladas somente uma via reacional é plausível.

Esquema 14 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o isoxantohumol e o radical HER.

Assim, tem-se que as constantes de velocidade aparentes obtidas para as reações envolvendo as flavanonas e o radical HER consistem na somatória das constantes de velocidade inerentes às reações consecutivas de abstração do átomo de hidrogênio e recombinação radicalar, conforme ilustrado no **Esquema 14** como k_1 e k_2 , respectivamente.

4.1.4. Investigação da reatividade dos compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER.

4.1.4.1. Isolamento, purificação e caracterização química da proteína *LTP1*.

Conforme descrito no item 3.2., a proteína *LTP1* foi isolada e purificada empregando-se dois processos cromatográficos: cromatografia de troca catiônica e cromatografia de exclusão molecular. Assim, do cromatograma obtido no primeiro processo de separação, **Figura 22**, observa-se a eluição da proteína de interesse em 0,17 mol L⁻¹ de NaCl ao aplicar o gradiente de separação salino.

Figura 22 - Cromatograma resultante da etapa de isolamento da proteína *LTP1* por cromatografia de troca catiônica.

A presença de proteína *LTP1* foi confirmada através da análise do gel de *SDS-PAGE* de 18% acrilamida pela presença das bandas próximas ao padrão de massa molecular igual a 14,4 kDa, a qual estava contida nas frações de 2 a 4, **Figura 23**. No entanto, devido à presença de impurezas, as frações 2-4, contendo a proteína de interesse, foram submetidas a um novo processo de separação cromatográfica.

Figura 23 - Géis de *SDS-PAGE* (18% - acrilamida) decorrentes da análise das frações coletadas no processo de isolamento da proteína *LTP1*. Análise do padrão de massa molecular (1) e das frações coletadas por processo de separação por cromatografia de troca catiônica (2-9).

A proteína *LTP1* foi então purificada através de uma coluna de exclusão molecular, cujo cromatograma resultante encontra-se apresentado na **Figura 24**. As frações aqui coletadas, decorrentes de três injeções subsequentes, foram analisadas em gel de 18% acrilamida, *SDS-PAGE*, e então se constatou que, de fato, a proteína *LTP1* foi devidamente purificada, apresentando um elevado grau de pureza, **Figura 25**.

Figura 24 - Cromatograma resultante da etapa da purificação da proteína *LTP1* por cromatografia de exclusão molecular.

Figura 25 - Géis de *SDS-PAGE* (18% - acrilamida) decorrentes da análise das frações coletadas no processo de purificação da proteína *LTP1*. Análise do padrão de massa molecular (1) e das frações coletadas por processo de separação por cromatografia de exclusão molecular (2-7).

Ainda, caracterizou-se quimicamente a proteína *LTP1* isolada por espectrometria de massas *MALDI-TOF* (do inglês “*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*”), cujo espectro obtido revela a presença majoritária de quatro íons moleculares, indicados na **Figura 26** por A, B, C e D. Os compostos referentes aos íons moleculares A, B e C foram atribuídos às diferentes formas conferidas á proteína *LTP1*, as quais apresentam massas moleculares variando entre 9 a 10 kDa e advém de diversas fontes de cereais adicionados, tais como trigo, malte e cevada^{63,66}. Por outro lado, ao composto cuja massa molecular identificada foi 10,8 kDa (D) foi atribuído a forma glicosilada da proteína resultante da reação entre os açúcares redutores decorrentes da reação de Maillard, aminoácidos do N-terminal e resíduos de lisina na estrutura proteica^{63,66}.

Figura 26 - Espectro de Massas decorrente da análise por *MALDI-TOF-MS* da proteína *LTP1* isolada.

4.1.4.2. Reatividade dos compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER.

A reatividade dos compostos contendo grupos tióis livre frente ao radical HER foi determinada através da obtenção das constantes de velocidade aparentes das reações supracitadas, as quais se encontram na **Tabela 4**. Nota-se que os valores das constantes de velocidade (de 10^8 a 10^9 L mol⁻¹ s⁻¹) obtidas para os compostos contendo grupos tióis livre estão próximas ao limite de difusão em meio aquoso, o que deixa patente a alta reatividade destes compostos frente ao radical HER.

Tabela 4 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre e bloqueado, bem como aminoácidos, determinadas por *spin-trapping* RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C.

Substratos	k_{ap} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
Cisteína	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$
Glutathiona	$(7,1 \pm 0,2) \times 10^8$
Cys-Gly	$(9,0 \pm 0,2) \times 10^8$
His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp	$(4,9 \pm 0,2) \times 10^8$
Asn-Arg-Cys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Cys-Trp-Asn	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^9$
N-acetilcisteína	$(8,7 \pm 0,1) \times 10^8$
Homocisteína	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^9$
Cisteína metil éster	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^9$
DTT	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^9$
Cistina	N.R.*
Glutathiona oxidada	N.R.*
Metionina	N.R.*
S-metil-L-cisteína	N.R.*
<i>LTP1</i> (isolada)	N.R.*
<i>LTP1</i> reduzida (adição de TCEP)	$(6,1 \pm 0,2) \times 10^9$
Histidina	$(7,5 \pm 0,3) \times 10^4$
Serina	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^4$
Triptofano	$(6,7 \pm 0,1) \times 10^5$
Lisina	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^5$

* N.R.: Não Reativo.

Paralelamente, testou-se a reatividade dos compostos contendo os grupos tióis oxidados ou bloqueados, como pontes de dissulfeto e radicais orgânicos ligados ao átomo de enxofre, frente ao radical HER, os quais se mostraram não reativos, o que deixa evidente que a reação está diretamente conectada ao grupo tiol. Por outro lado, os aminoácidos histidina, serina, triptofano e lisina, presentes na estrutura proteica da *LTP1* e reconhecidamente suscetíveis aos processos oxidativos^{86,87}, apresentaram constantes de velocidade aparentes na ordem de 10^4 a 10^5 L mol⁻¹ s⁻¹, indicando que a extensão da reação é maior para os compostos/aminoácidos contendo grupos tióis livre. Por fim, a reatividade da proteína *LTP1* isolada foi avaliada, não sendo observada reação. Este fato indica que possivelmente a proteína está em sua forma oxidada; ou seja, a proteína *LTP1* contém quatro pontes de dissulfeto, as quais se encontram ilustradas (destacadas em verde) na **Figura 27**.

Figura 27 - Estrutura quaternária da proteína *LTP1* oxidada⁶⁵. Figura gerada a partir do software Weblab Viewer Lite.

De fato, a oxidação dos grupos RSH pode ter ocorrido durante o processo de isolamento e purificação da proteína ou mesmo durante o processo de armazenamento da cerveja utilizada. Adicionou-se então 4,5 equivalentes de TCEP para promover a redução das pontes de dissulfeto e, após decorridos 30 minutos para promover a redução, avaliou-se a reatividade da mesma em sua forma reduzida frente ao radical HER. Neste caso, a proteína *LTP1*, em sua forma reduzida, mostrou-se altamente reativa, cuja constante de velocidade aparente obtida foi igual a $(6,1 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Também foi avaliada a interferência do TCEP oxidado, formado durante a reação de redução dos tióis oxidados, nos experimentos cinéticos. Para tanto, utilizou-se como reagentes na reação de redução a cistina e a glutathiona oxidada, a qual foi promovida pela adição de 1,5 equivalentes de TCEP. Depois de decorridos 30 minutos de reação, as cinéticas foram conduzidas, obtendo, ao final, constantes de velocidade aparentes iguais a $(1,1 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $(6,9 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para a cisteína e glutathiona reduzidas *in situ*, respectivamente. De fato, as constantes de velocidade aqui obtidas são estatisticamente iguais ($p = 0,05$) às constantes apresentadas na **Tabela 4**, as quais se referem aos mesmos substratos, porém, aplicando-os diretamente, em suas formas reduzidas, nas reações cinéticas.

Logo, constata-se que o produto decorrente da oxidação do TCEP não interfere nos resultados dos experimentos cinéticos.

Com a finalidade de investigar o mecanismo da reação envolvendo o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre, avaliou-se o efeito isotópico cinético ao conduzir a reação em meio deuterado (D_2O/CH_3CH_2OD). Neste contexto, utilizou-se como substratos a cisteína e a glutatona e ao comparar os comportamentos lineares obtidos em ambos os meios, normal e meio deuterado, **Figura 28**, verificou-se um decréscimo nas inclinações das retas referentes ao meio deuterado.

Figura 28 - Gráfico $(F/F-1) \cdot k_2 \cdot [4\text{-POBN}]$ versus concentração de cisteína (A) e glutatona (B) em meio normal (—■—) e deuterado (—●—). Medidas obtidas pela análise das áreas dos espectros de RPE. $T = 25,0 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$; 1 minuto de reação.

Como resultado, tem-se um decréscimo acentuado na captação do radical pelos substratos em meio deuterado, resultando na diminuição das respectivas constantes de velocidade aparentes obtidas, conforme consta na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e cisteína e glutathione em meio normal ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e deuterado ($\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$) determinadas por *spin-trapping* RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C.

Substratos	$k_{\text{ap}} (k_{\text{H}})$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) $\text{H}_2\text{O}/\text{Etanol}$	$k_{\text{ap}} (k_{\text{D}})$ ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) $\text{D}_2\text{O}/\text{Etanol-d}_1$	$k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$
Cisteína	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^8$	2,2
Glutathione	$(7,1 \pm 0,2) \times 10^8$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^8$	2,3

Assim, a partir da análise entre as constantes de velocidade aparentes obtidas em ambos os meios, verificou-se que a razão entre estas ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$) foi de 2,2 e 2,3 para a cisteína e glutathione, respectivamente. Logo, os dados remetem a um efeito isotópico cinético primário, no qual a troca do átomo de hidrogênio pelo isótopo deutério no grupo tiol confere um aumento na energia de ativação para a abstração do átomo pelo radical. Portanto, conclui-se que a reação é governada pela abstração do átomo de hidrogênio do grupo tiol pelo radical HER.

4.1.4.3. Identificação dos produtos da reação entre os compostos contendo grupos tióis livre e o radical HER.

Os produtos da reação entre a glutathione e o radical HER foram tentativamente identificados por espectrometria de massas (*HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*) pela infusão direta da mistura reacional. Neste contexto, o espectro de massas resultante da análise da composição final da reação encontra-se apresentado na **Figura 29**. Aqui, nota-se, pela presença do íon quasi-molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ cuja razão m/z é igual a 306,0769 (erro de 1,1 ppm calculado para $[\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}_3\text{S} - \text{H}]^- = 306,0759$ m/z), que a glutathione não foi completamente consumida na reação. Analogamente, observou-se a presença do íon quasi-molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$

em 661,1454 m/z (erro de 2,9 ppm calculado para $[\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_{12}\text{N}_6\text{S}_2 - \text{H}]^- = 611,1441 \text{ m/z}$), o qual refere-se à formação do dissulfeto alusivo à glutathiona oxidada (GSSG). De fato, a formação da glutathiona oxidada na reação em estudo encontra-se previamente reportada na literatura^{67,68}; contudo, a formação do intermediário ácido sulfênico não foi detectado pela adição da armadilha dimedona à mistura reacional.

Figura 29 - Espectro de massas (*HESI-II-(-)-MS*) da mistura reacional entre a glutathiona e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min de reação.

Logo, a partir deste conjunto de dados, pôde-se inferir uma proposta para o mecanismo da reação, o qual se inicia pela abstração do átomo de hidrogênio do grupo tiol pelo radical HER, culminando na formação do radical tiila ($\text{RS}^\bullet$), que, ao recombinar-se com outro radical tiila, forma o respectivo dissulfeto derivado do tiol inicial (RSSR), **Esquema 15**.

Esquema 15 - Mecanismo proposto para a reação entre o radical HER e os compostos contendo grupos tióis livre.

4.1.4.4. Quantificação do teor de tióis – presente e total – contidos em diferentes cervejas.

A quantificação da concentração dos compostos contendo grupos tióis livre presentes em sete tipos de cerveja foi efetuada utilizando a metodologia estabelecida por Abrahamsoon e colaboradores⁸⁹ ao empregar como agente derivatizante o ThiolGlo-1, o qual reage com o íon sulfito e tióis para formar adutos altamente fluorescentes, conforme ilustrado no **Esquema 16**. De acordo com o mecanismo da reação supracitada, o sulfito adiciona-se ao grupo maleimida do ThiolGlo-1 via adição de Michael formando, após uma hidrólise, dois isômeros, compostos (a) e (b), **Esquema 16**. O composto (c), **Esquema 16**, refere-se ao aduto formado na reação entre os tióis e o ThiolGlo-1.

Esquema 16 - Mecanismo da reação de derivatização do ThiolGlo-1 e sulfito e tiol proposto por Abrahamsoon⁸⁹.

Assim, de acordo com o perfil cromatográfico resultante da análise do teor de tióis presentes na cerveja #4, apresentado na **Figura 30**, verifica-se a presença de três bandas de eluição majoritárias, os quais estão indicados como eluatos A, B e C no cromatograma. Neste contexto, verificou-se que os dois primeiros eluatos, cujos (t_r) são 5,6 e 7,4 minutos para os eluatos A e B respectivamente, correspondem à eluição dos adutos derivados do sulfito, ao passo que o último eluato (C), em (t_r) igual a 11,2 minutos, refere-se à coeluição dos adutos derivados dos tióis presentes na bebida.

Figura 30 - Cromatograma resultante da análise de tióis presentes na cerveja #4. Bandas de eluição A, em $t_r = 5,6$ min, e B, em $t_r = 7,4$ min, correspondem aos eluatos derivados do sulfito; banda de eluição C, em $t_r = 11,2$ min, corresponde ao eluato derivado dos compostos contendo grupos tióis.

Para a quantificação do teor de tióis totais nas cervejas, primeiramente adicionou-se TCEP nas amostras, o qual, ao reduzir as pontes de dissulfeto dos tióis oxidados (RSSR), conferiu um aumento no nível de tióis livre no produto. Em seguida, as amostras foram derivatizadas pela adição de ThiolGlo-1. Assim, pela análise do cromatograma resultante da adição do agente redutor, contido na **Figura 31**, observa-se a presença majoritária de quatro bandas de eluição, denominados como A, B, C e D, as quais são referentes aos isômeros derivados do sulfito, eluatos A e B em (t_r) iguais a 5,6 e 7,4 minutos, respectivamente, derivados do excesso de TCEP adicionado, eluato C em (t_r) igual a 14,9 minutos, e derivados dos tióis, eluato D em (t_r) igual a 18,2 minutos. Ainda, ao comparar o cromatograma obtido na ausência de TCEP com o perfil cromatográfico resultante da adição de TCEP, nota-se um aumento expressivo do pico referente à coeluição dos derivados dos tióis, o que reflete o aumento no teor dos mesmos nas amostras. Por outro lado, verifica-se que a adição de TCEP nas cervejas não interfere na quantificação de sulfito, uma vez que as bandas de eluição A e B mantêm-se constantes.

Figura 31 - Cromatograma resultante da análise de tióis totais contidos na cerveja #4. Bandas de eluição A, em $t_r = 5,6$ min, e B, em $t_r = 7,4$ min, correspondem aos eluatos derivados do sulfito; banda de eluição C, em $t_r = 14,9$ min, corresponde ao eluato derivado do excesso de TCEP adicionado; banda de eluição D, em $t_r = 18,2$ min, corresponde aos eluatos derivados dos compostos contendo grupos tióis.

A **Figura 32** apresenta o teor de tióis totais obtidos pela adição de TCEP em diferentes cervejas. Do gráfico é possível observar que a concentração ideal de adição de TCEP para a redução dos tióis oxidados é específica para cada cerveja, sendo esta proporcional à concentração de tióis livre presentes inicialmente nas amostras.

Figura 32 - Concentração total de compostos contendo tióis livre em diferentes cervejas *versus* concentração de TCEP adicionado.

No entanto, observou-se, em algumas amostras, um decréscimo no teor dos tióis em condições onde a concentração de TCEP adicionada foi elevada. Assim, para avaliar o efeito da adição de TCEP na quantificação dos compostos contendo tióis livre, bem como a eficiência da reação de redução, soluções modelos contendo glutathione e glutathione oxidada foram preparadas em tampão Tris- (ca. $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$) e a estas adicionadas diferentes concentrações de TCEP (ca. $(2,5 \text{ e } 4,5) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em tampão Tris- ca. $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$). Através do monitoramento das concentrações de tióis presentes nas soluções por HPLC, após a derivatização das amostras pela adição de ThiolGlo-1, construiu-se uma curva de calibração para a glutathione e glutathione oxidada, **Figura 33 (a) e (b)**.

Figura 33 - Curva de calibração para (A) glutathione e (B) glutathione oxidada em tampão Tris- ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,5$) após a adição de diferentes concentrações de TCEP (mol L^{-1}): (—●—) $2,5 \times 10^{-4}$; (—▲—) $4,5 \times 10^{-4}$.

Da análise do gráfico contido na **Figura 33 (a)**, verifica-se que de fato o excesso de TCEP adicionado em relação à concentração de tiol presente não interfere na quantificação do mesmo, resultando em um coeficiente linear da curva de calibração próximo à zero. Analogamente, constatou-se a eficiência do TCEP na redução de tióis oxidados pelo comportamento linear da curva de calibração obtida utilizando-se a glutathione oxidada, **Figura 33 (b)**, cujo coeficiente linear é próximo à zero. Ainda, verificou-se que o coeficiente angular da curva de calibração utilizando a glutathione oxidada, **Figura 33 (b)**, guarda uma relação de duas vezes o valor do coeficiente angular da curva obtida a partir da glutathione, **Figura 33 (a)**. Esta relação está intrinsecamente relacionada com a estequiometria da reação de redução, na qual uma molécula de tiol oxidado (RSSR) gera, ao final da reação de redução, duas moléculas de tióis livre (RSH). Logo, este conjunto de dados corrobora com o fato de que o TCEP reduz de forma eficaz os tióis oxidados e que o excesso de TCEP não interfere na quantificação dos tióis livre.

4.1.4.5. Quantificação do teor de proteína em diferentes cervejas.

Quantificou-se o teor de proteína nas cervejas estudadas empregando o método de Bradford⁹¹. Os teores proteicos obtidos foram correlacionados com a concentração dos compostos contendo grupos tióis livre, presentes e totais, obtendo assim um comportamento linear em ambos os casos, **Figura 34 (a)** e **(b)**, respectivamente. Assim, constata-se que o teor de proteína e a concentração de tióis, presentes e totais, contidos nas amostras de cerveja, guardam uma relação direta, remetendo ao fato de que as proteínas majoritárias presentes nas cervejas são fontes de tióis. Além disso, verifica-se que os interceptos na ordenada das curvas obtidas a partir da regressão linear dos pontos não cruza o zero. Isto é reflexo da limitação do método de Bradford, o qual detecta proteínas com massas moleculares acima de 5 kDa⁹¹. Com

efeito, as proteínas que apresentam massas moleculares abaixo de 5 kDa não foram detectadas, sendo, portanto, sua concentração subestimada.

Figura 34 - Concentração de tióis presentes (a) e totais (b) em diferentes cervejas *versus* concentração de proteína total determinada pelo método de Bradford⁹¹.

Portanto, fica evidente que as proteínas presentes nas cervejas constituem uma importante fonte de tióis na bebida, visto que o aumento na concentração das proteínas acarreta invariavelmente no aumento da concentração de tióis. Assim, as proteínas mostram-se como fontes importantes de tióis, o que pode refletir no equilíbrio redox do produto.

4.1.4.6. Investigação da estabilidade redox conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre e pela adição de TCEP na cerveja.

Avaliou-se a estabilidade redox conferida pelos compostos contendo grupos tióis livre na cerveja através dopagem da mesma pela adição de glutathiona reduzida (ca. $(1,0 \text{ e } 2,0) \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Neste contexto, a formação do radical HER foi acompanhada ao monitorar-se o sinal do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ por RPE em amostras da cerveja #4 submetidas ao envelhecimento acelerado ($60,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Assim, a partir da análise do gráfico contido na **Figura 35**, não se observou nenhum efeito antioxidante dos tióis na bebida, uma

vez que o período de indução (do inglês, “*lag-phase*”) na solução controle (sem aditivo) foi exatamente o mesmo verificado nas amostras dopadas com glutathiona.

Figura 35 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ medida por RPE após o período de indução em amostras da cerveja #4 submetidas a um envelhecimento aeróbico acelerado ($60,0 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$), contendo diferentes concentrações de glutathiona (mol L^{-1}): ($\text{--}\diamond\text{--}$) $0,0$; ($\text{--}\square\text{--}$) $1,0 \cdot 10^{-3}$; ($\text{--}\triangle\text{--}$) $2,0 \cdot 10^{-3}$.

Isto provavelmente se deve ao fato de que as medidas não foram conduzidas em atmosfera inerte e, portanto, sabe-se que a presença de oxigênio molecular dissolvido no meio reage prontamente com o radical HER, culminando na formação de acetaldeído com constante de velocidade $k_2 = 1,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁹. Logo, a reação entre o radical e o oxigênio é favorecida em detrimento da reação com a glutathiona ($k_{ap} = (7,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ mol L}^{-1}$).

A estabilidade redox conferida pela adição de TCEP na cerveja foi também averiguada ao dopar-se amostras da cerveja #4 com diferentes concentrações do agente redutor (ca. $(1,0, 2,5 \text{ e } 5,0) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e submetê-las ao envelhecimento acelerado ($60,0 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Analisando as intensidades relativas do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ das amostras, **Figura 36**, constata-se que a adição de TCEP culmina na diminuição da estabilidade redox da bebida refletida pela diminuição do período de indução.

Figura 36 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ analisado por RPE após o período de indução (“lag-phase”) em amostras da cerveja #4 contendo diferentes concentrações de TCEP (mol L^{-1}): (a) 0,0; (b) $1,0 \times 10^{-4}$; (c) $2,5 \times 10^{-4}$ e (c) $5,0 \times 10^{-4}$; submetidas a um envelhecimento aeróbico acelerado ($60,0 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Logo, os dados aqui apresentados sugerem que a adição de TCEP colabora para a intensificação da formação do radical HER, a qual poderá estar ocorrendo via reação do tipo Fenton.

4.1.4.7. Influência do TCEP na reação de Fenton.

Para avaliar a influência da adição de TCEP na reação de Fenton, soluções modelo contendo a armadilha química 4-POBN, H_2O_2 , Fe(II) e etanol foram dopadas com diferentes concentrações de TCEP e em seguida acompanhou-se a formação do radical HER pelo monitoramento do sinal do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ via RPE. Assim, considerando a intensidade do sinal de uma solução controle (sem adição de TCEP) como referência, nota-se, através da **Figura 37**, um aumento gradativo na intensidade do sinal a partir de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de TCEP adicionado. Logo, constata-se que a adição do TCEP intensifica a geração do radical hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$), o qual reage com o etanol em solução ($k_2 = 1,7 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁶⁹, culminando no aumento da formação do radical HER.

Figura 37 - Geração do aduto radical $[4\text{-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^{\bullet}$ medida por RPE em soluções aquosas modelo contendo etanol (5,8% v/v), 4 mL de 4-POBN ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 80 μL de H_2O_2 ($24,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 20 μL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($22,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e diferentes concentrações de TCEP (de 0,1 a $40,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

4.1.4.8. Ensaio de redução do Fe(III) a Fe(II) pela adição de TCEP.

Uma possível via reacional para geração do radical hidroxila pela adição de TCEP consiste na redução do Fe(III) a Fe(II), o qual irá reagir com o peróxido de hidrogênio e então formar o radical supracitado. De fato, constata-se que termodinamicamente o TCEP, cujo potencial de oxidação é $-0,045 \text{ V versus ENH}^{98}$, pode reduzir o íon de Fe(III) a Fe(II) ($E^0 = +0,77 \text{ V}$)⁹⁹. Assim, para avaliar a habilidade do TCEP em reduzir o íon de Fe(III), adicionou-se a ferrozina em soluções modelo contendo diferentes concentrações de TCEP e íons de Fe(III). A reação dos íons Fe(II) com a ferrozina leva a formação do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})]$, o qual absorve em $\lambda = 560 \text{ nm}^{93}$. Desta forma, a partir do gráfico apresentado na **Figura 38**, observa-se um aumento na intensidade da absorbância em 560 nm, o que reflete a formação do complexo supracitado e, conseqüentemente, comprova a redução do íon Fe(III) a Fe(II) pelo TCEP.

Figura 38 - Formação do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})]$ pela adição de TCEP em diferentes concentrações de FeCl_3 (mol L^{-1}): (a) $1,8 \cdot 10^{-5}$; (b) $3,7 \cdot 10^{-5}$; (c) $7,4 \cdot 10^{-5}$.

4.1.5. Investigação da reatividade de diferentes lipídeos frente ao radical HER.

A reatividade dos lipídeos frente ao radical HER foi determinada através da obtenção das constantes de velocidade aparentes ao empregar uma abordagem cinética de competição e os substratos contidos na **Figura 7**, conforme descrito no item 3.5.2. A **Tabela 6** resume os valores das constantes de velocidade aparentes obtidas, entre as quais se destaca a constante obtida para a reação envolvendo o metil docosahexanoato, cujo valor é de $(2,7 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por outro lado, nenhuma reação foi observada para a reação entre o radical e o metil oleato, o qual contém apenas uma instauração em sua estrutura e, portanto, não apresenta átomos hidrogênio (bis)alílicos.

Tabela 6 - Constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e os lipídeos determinadas por *spin-trapping* RPE, em 1 min de reação e a temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C.

Substratos	BDE C-H (kJ mol ⁻¹)	Número de hidrogênios (bis)alílicos	k _{ap} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
Colesterol	328 (C ₇ -H) ¹⁰⁰	0	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^6$
Ergosterol	296 (C ₁₄ -H) ¹⁰¹	0	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^7$
Metil oleato	331 (C ₈ -H) ¹⁰²	0	N.R.*
Metil linoleato conjugado	326 (C ₈ -H) ¹⁰¹	0	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^7$
Metil linoleato	294 (C ₁₁ -H) ¹⁰²	1	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^6$
Metil linolenato	293 (C ₁₁ -H) ¹⁰²	2	$(7,6 \pm 0,1) \times 10^6$
Metil araquidonato	288 (C ₁₀ -H) ¹⁰³	3	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^7$
Metil docosahexanoato	267 (C ₁₂ -H) ¹⁰³	5	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^7$

* N.R.: Não Reativo.

De acordo com os dados obtidos, a reatividade dos ésteres derivados dos ácidos graxos poli-insaturados não-conjugados frente ao radical HER mostrou-se estar diretamente conectada à habilidade dos substratos em doar átomos de hidrogênio (bis)alílicos para a espécie radicalar. De fato, esta capacidade dos metil ésteres não-conjugados em doar átomos de hidrogênio (bis)alílicos é refletida pelo decréscimo dos valores das *BDEs* das ligações C-H envolvendo os referidos átomos de hidrogênios.

Conforme pode ser observado na **Figura 39**, as constantes de velocidade aparentes das reações envolvendo os ésteres derivados dos ácidos graxos poli-insaturados não-conjugados guarda uma relação direta e linear ($R^2 = 0,989$) com o número de grupos metilênicos (bis)alílicos suscetíveis a oxidação presentes nas moléculas dos substratos aqui inseridos. Logo, constata-se que a reatividade dos referidos metil ésteres frente ao radical HER é governada pelo fator entrópico, uma vez que constantes de velocidade aparentes obtidas apresentaram uma maior dependência com relação ao número de átomos de hidrogênio (bis)alílicos presentes nas moléculas dos substratos do que em relação aos respectivos valores de *BDE* das ligações C-H envolvendo tais átomos de hidrogênio.

Figura 39 - Gráfico das constantes de velocidade aparentes das reações entre o radical HER e ésteres derivados dos ácidos graxos insaturados *versus* número de grupos metilênicos (bis)alílicos dos substratos.

De acordo com a literatura¹⁰², os metil ésteres derivados dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico apresentam os seguintes potenciais de oxidação (E_{ox}) + 2,12, + 2,06 e + 2,05 V *versus* ENH, respectivamente. Ainda, conforme pode ser verificado através da leitura dos voltamogramas contidos na **Figura 40**, o metil linoleato conjugado e o ergosterol apresentaram picos de oxidação em + 1,95 e + 1,40 V *versus* ENH, **Figuras 40 (a) e (b)**, respectivamente, sendo ambos os voltamogramas caracterizados pela presença de processos irreversíveis assinalados pela ausência da onda de varredura catódica. Logo, pode-se inferir que o processo de oxidação lipídica pelo radical em estudo via transferência de elétron é, de fato, termodinamicamente inviabilizada, uma vez que o potencial de redução do radical HER ($E = + 0,98$ V *versus* ENH)⁹⁶ é significativamente menor que os potenciais de oxidação obtidos para os diferentes lipídeos.

Figura 40 - Voltamogramas cíclicos do (a) metil linoleato conjugado e (b) ergosterol, em acetonitrila contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte. Eletrodos: platina (trabalho e contra-eletrodo), ferroceno (referência interna). Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} .

(*) Impureza.

Portanto, constata-se que a reação entre o radical HER e os metil ésteres derivados dos ácidos graxos poli-insaturados não-conjugados e esteróis é provavelmente governada pelo processo de oxidação via transferência de átomo de hidrogênio (bis)alílico dos substratos para o radical.

Surpreendentemente, o metil linoleato conjugado (9E,11E) apresentou uma elevada reatividade ($k_{ap} = (1,3 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) frente ao radical HER em relação à reatividade apresentada pela série dos lipídeos em estudo. De fato, a reatividade do metil éster conjugado

derivado do ácido linoleico não pode ser atribuída à reação de transferência de elétrons do substrato para a espécie radicalar, pois o lipídeo aqui inserido apresenta um potencial de oxidação ($E_{\text{ox}} = + 1,95 \text{ versus ENH}$) significativamente mais positivo que o potencial de redução do radical HER ($E = + 0,98 \text{ V versus ENH}$)⁹⁶. Por outro lado, a reação supracitada também não pode ser governada pela reação de transferência de átomo de hidrogênio (bis)alílico, uma vez que o lipídeo em estudo não apresenta grupos metilênicos (bis)alílicos susceptíveis a oxidação.

Com a finalidade de obter as energias dos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* dos metil ésteres conjugados e não-conjugados, suas estruturas químicas foram mimetizadas às moléculas do 1,3- e 1,4-hexadieno e então efetuou-se os cálculos *ab initio* utilizando o método *DFT*. Assim, a partir da comparação entre as energias dos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* dos dienos e a energia do orbital *SOMO* do radical, **Figura 41**, verifica-se uma menor diferença de energia ($\Delta E = 174 \text{ kJ mol}^{-1}$) entre os orbitais *HOMO* e *SOMO* do dieno conjugado e do radical, respectivamente.

Figura 41 - Diagrama de energia dos orbitais de fronteira *HOMO* e *LUMO* do 1,3- e 1,4-hexadieno e do orbital de fronteira *SOMO* do radical HER.

De fato, este menor intervalo energético (ΔE) possivelmente resulta em uma maior facilidade na interação entre os orbitais *HOMO-SOMO* do lipídeo e do radical, respectivamente, e confere ao radical HER um caráter eletrofílico, culminando em uma reação de adição eletrofílica do radical ao sistema conjugado do metil éster derivado do ácido linoleico.

Pela leitura das constantes de velocidade aparentes apuradas para a reação envolvendo os diferentes lipídeos na captação do radical HER, verifica-se que a reatividade apresentada pelos esteróis diverge do comportamento linear apresentado pelos olefinas acíclicas não-conjugadas, pois, apesar de ambos os esteróis colesterol e ergosterol não apresentarem átomos de hidrogênios (bis)alílicos em suas estruturas, estes exibiram uma reatividade elevada frente à espécie radicalar. Esta diferença na reatividade possivelmente está associada ao arranjo conformacional que as ligações C-H alílicas assumem na estrutura cíclica, o qual confere uma menor rotação entre as ligações químicas da estrutura e permite uma sobreposição mais efetiva entre os orbitais π do alceno e o orbital p do radical gerado do cicloalceno¹⁰⁴.

Com respeito à reatividade dos esteróis frente ao radical HER, o ergosterol mostrou-se ser 19 vezes mais reativo que o colesterol. Estudos têm apontado uma maior suscetibilidade a processos oxidativos por parte do cicloalceno insaturado contendo duplas ligações conjugadas, tais como o ergosterol, a qual foi atribuída aos efeitos na estabilidade conformacional conferidos pela ressonância presente na molécula^{103,104}. De fato, a estabilidade na conformação promovida pela ressonância da molécula acarreta em uma maior estabilização do estado de transição e permite uma abstração dos átomos de hidrogênio alílicos mais efetiva^{103,104}.

4.1.5.1. Identificação dos produtos da reação e elucidação do mecanismo da reação envolvendo os metil ésteres não-conjugados derivados dos ácidos graxos e o radical HER.

Os produtos da reação entre os lipídeos e o radical HER foram tentativamente identificados empregando-se como substrato o metil linoleato, sendo a mistura reacional analisada pela técnica *UPLC-HESI-II-LTQ Orbitrap FT-MS*. A partir da leitura do cromatograma de íons total apresentado na **Figura 42 (a)**, nota-se a presença de quatro bandas de eluição decorrentes da reação, os quais estão identificados como A, B, C e D.

Figura 42 - (a) Cromatograma de íons total da solução alcoólica contendo os produtos decorrentes da reação do metil linoleato e o radical HER, sob atmosfera de Ar, $T = 25,0 \pm 0,2$ °C, $t = 1$ minuto de reação. (b) Espectro de massas (*HESI-II-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 19,0$ min (eluato B). (c) Espectro de massas (*HESI-II-(+)-MS*) com atribuição do íon do eluato em $t_r = 20,9$ min (eluato D).

(continua na página 116)

Os três primeiros eluatos, cujos (t_r) são 18,8, 19,0 e 19,6 minutos para as bandas de eluição A, B e C, respectivamente, referem-se aos produtos formados na oxidação primária do éster derivado do ácido linoleico, os quais apresentaram um mesmo padrão de fragmentograma, representado na **Figura 42 (b)** pelo espectro de massas obtido a partir do eluato B. Neste contexto, nota-se a presença do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ cuja razão m/z é de 311,4787 (erro de - 2,2 ppm calculado para $[C_{19}H_{34}O_3 + H]^+ = 311,4794$ m/z), o qual indica a formação de hidróxidos derivados do metil linoleato. Por outro lado, o espectro de massas obtido do eluato D, em (t_r) igual a 20,9 minutos, **Figura 42 (c)**, revelou a presença do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ em 295,4796 m/z (erro de - 1,3 ppm calculado para $[C_{19}H_{34}O_2 + H]^+ = 295,4800$ m/z), o qual refere-se à aluição do substrato inicial, indicando que o metil éster não foi completamente consumido na reação.

O estudo sistemático dos mecanismos que descrevem as principais vias de oxidação dos ácidos graxos insaturados tem sido o foco de muitos trabalhos científicos ao longo de cinquenta anos, os quais constatarem a formação dos derivados hidroperóxidos, peróxidos cíclicos e hidróxidos¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Logo, com base nos dados aqui observados e os que se encontram reportados na literatura, propôs-se o mecanismo de reação que rege a oxidação primária do metil linoleato ocasionada pela presença do radical HER, o qual pode ser extrapolado para os demais metil ésteres poli-insaturados não-conjugados e esteróis aqui inseridos.

Conforme apresentado no **Esquema 17**, a reação inicia-se pela abstração do átomo de hidrogênio (bis)alílico do metil linoleato (composto (a), **Esquema 17**) pelo radical HER, formando três radicais secundários estabilizados por ressonância, os quais seguem reagindo por dois caminhos.

Esquema 17 - Mecanismo de reação proposto para a reação entre o metil linoleato e o radical HER.

O caminho 1 resume a reação entre as espécies radiculares intermediárias e os oxigênio molecular, a partir da qual tem-se a formação dos radicais peroxilas que eventualmente abstraem átomos de hidrogênios do meio reacional, culminando na formação

dos hidroperóxidos. A presença de íons metálicos de Fe(II) conduz a clivagem dos grupos hidroperóxidos^{63,66} ao formar radicais alcóxila, que, após a abstração de mais um átomo de hidrogênio do meio reacional, gera os hidróxidos identificados (composto (b), **Esquema 17**). Por outro lado, o caminho 2 descreve a formação dos hidróxidos derivados do metil linoleato (composto (b), **Esquema 17**) pela recombinação direta entre os radicais intermediários, provenientes do metil éster, e os radicais hidroxila.

4.2. Comparação entre a reatividade apresentada pelos compostos de interesse frente o radical HER.

A partir das constantes de velocidade aparentes determinadas para a reação do radical HER com as lupulonas ($(2,9 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), com os terpenos ($(2,2 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o β -pineno, e $(1,5 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o terpinoleno), com os flavonoides prenilados ($(1,5 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a 6-prenilnaringenina, e $(3,6 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o xantohumol) e com os compostos contendo grupos tióis livre ($(4,9 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp, e $(6,1 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a proteína *LTP1*), aliada às demais constantes de velocidade reportadas na literatura envolvendo o radical HER e outros compostos presentes na cerveja, pôde-se inferir sobre a extensão da reação de degradação térmica conferida durante o envelhecimento da bebida. Neste contexto, de Almeida e colaboradores^{23,30} demonstraram que o radical HER reage prontamente com as isohumulonas, em especial com os diastereoisômeros *trans*-, cuja constante de velocidade aparente é de $9,2 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁹⁵. Encontram-se também reportadas na literatura as constantes de velocidade específicas para a reação envolvendo compostos fenólicos, tais como quercetina e kaempferol, as quais são da ordem de $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁷³.

Sabe-se que as concentrações das isohumulonas e compostos contendo grupos tióis livre presentes na cerveja varia entre $(0,4 \text{ a } 2,2) \times 10^{-4}$ ¹⁰⁸ e $(1,3 \text{ a } 4,6) \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ⁶², respectivamente. Adicionalmente, encontra-se reportada na literatura⁷⁴ a concentração conferida aos compostos fenólicos presentes na bebida, a qual foi estimada como sendo igual a $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ expressa em equivalentes de ácido gálico. Pode-se, ainda, assumir as concentrações do isoxantohumol $((0,1 \text{ a } 9,7) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹)³⁹ e do linalol $(\sim 2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹)^{28,109} como sendo as concentrações dos flavonoides prenilados e terpenos presentes na cerveja, respectivamente, uma vez que estes são os constituintes majoritários dos prenilflavonoides e terpenos identificados na bebida.

Assim, considerando as concentrações dos constituintes utilizados neste trabalho e comparando as respectivas constantes de velocidade aparentes obtidas para a reação envolvendo estes compostos e o radical HER, conclui-se que, apesar das substâncias fenólicas estarem presentes em concentrações superiores, a extensão da reação de oxidação térmica na cerveja é maior para os ácidos amargos do lúpulo (lupulonas e isohumulonas), seguida pela reação envolvendo os compostos contendo grupos tióis livre, flavonoides prenilados e terpenos.

Com respeito à reatividade apresentada pelos diferentes lipídeos avaliados frente ao radical HER, conclui-se que, de fato, os flavonoides prenilados podem conferir um significativo efeito antioxidante no organismo, em especial no fígado, devido às suas características lipofílicas. Desta forma, considerando uma absorção eficiente dos compostos polifenólicos prenilados pelo organismo humano, estes podem prontamente proteger a membrana celular contra possíveis danos ocasionados pelo radical HER gerado como consequência do consumo abusivo de bebidas alcóolicas.

4.3. Reatividade dos compostos de interesse frente ao radical fenoxila.

A partir do método descrito no item 3.13, a formação do radical fenoxila ($\text{ArO}^\bullet$) se deu a partir da abstração de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila da molécula do fenol pelo radical *tert*-butoxila ($t\text{-BuO}^\bullet$), o qual foi gerado pela irradiação do di-*tert*-butilperóxido em $\lambda = 355 \text{ nm}$, conforme ilustrado no **Esquema 18**.

Esquema 18 - Ilustração da reação de formação do radical fenoxila a partir da irradiação do di-*tert*-butilperóxido em $\lambda = 355 \text{ nm}$.

Pela leitura do espectro de diferença de absorção eletrônico de transientes obtido nas condições experimentais, apresentado na **Figura 43**, nota-se a presença de duas bandas, uma mais intensa centrada em 390 nm e outra de menor intensidade centrada em 600 nm . De fato, estas bandas são decorrentes das absorções do transiente alusivo ao radical fenoxila e estão de acordo com os relatos da literatura¹¹⁰.

Figura 43 - Espectro de absorção do transiente alusivo ao radical fenoxila. Solução irradiada em $\lambda = 355$ nm contendo di-*tert*-butil-peróxido (70 % v/v) e fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila), sob atmosfera de Ar e mantida a $25,0 \pm 0,2$ °C.

Através do monitoramento da diferença de absorbância do transiente em 390 nm, apresentado na **Figura 44**, obteve-se o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do radical $\text{ArO}^\bullet$, cujo valor estimado foi igual a 7 μs .

Figura 44 - Curva de decaimento exponencial de primeira-ordem referente ao transiente alusivo ao radical fenoxila. Solução irradiada em $\lambda = 355$ nm contendo di-*tert*-butil-peróxido (70 % v/v) e fenol ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; em acetonitrila), sob atmosfera de Ar e mantida a temperatura de $25 \pm 0,2$ °C; $\lambda_{\text{(leitura)}} = 390$ nm.

O valor de $t_{1/2}$ obtido experimentalmente é superior ao valor reportado na literatura, cujo valor é 2,4 μs determinado em meio aquoso¹¹⁰. Esta diferença entre os valores de $t_{1/2}$

possivelmente está relacionada aos diferentes meios empregados (solventes próticos e apróticos), uma vez que em solventes apróticos (neste caso, acetonitrila) a espécie radical tende a apresentar-se mais estável.

Empregando-se diferentes concentrações dos substratos de interesse (lupulonas, isohumulonas, terpenos e flavonoides prenilados), a reatividade destes frente ao radical fenoxila foi estimada. Nenhuma reatividade foi observada empregando-se os ácidos amargos derivados do lúpulo, uma vez que a constante de velocidade de decaimento do radical é inalterada pela presença do substrato.

O estudo da reatividade envolvendo o radical fenoxila frente a compostos orgânicos foi o foco de diversos estudos^{94,111,112}. Neste contexto, diversos trabalhos sugerem que o mecanismo envolvido neste tipo de reação é governado via transferência de elétron dos substratos pelo radical supracitado¹¹¹. Sabe-se que o potencial de oxidação das lupulonas é de + 1,1 V *versus* ENH, ao passo que os potenciais verificados para as isohumulonas, em suas formas aniônica e molecular, são + 1,4 e + 1,8 V *versus* ENH⁹⁵, respetivamente. Ainda, da literatura, tem-se que o potencial de redução de um elétron do radical fenoxila derivado do fenol é igual a + 0,8 *versus* ENH¹¹³. Logo, verifica-se que o potencial de redução do radical é significativamente menor que os potenciais de oxidação obtidos para os ácidos amargos derivados do lúpulo. Portanto, a inercia destes substratos frente ao radical fenoxila pode ser explicada com base nos respectivos potenciais redox, uma vez que a reação via transferência de elétron é termodinamicamente inviabilizada.

O mesmo feito foi observado para os terpenos em estudo. Analogamente, Cardoso e colaboradores⁷⁴ também não observaram nenhuma reatividade dos terpenos frente à desativação do estado tripleto excitado da riboflavina. A partir deste achado, pode-se inferir que o potencial de oxidação dos terpenos é significativamente diferente e superior ao potencial de redução da riboflavina tripleto (+ 2,2 V *versus* ENH)⁷⁴. Desta forma, a reação

entre os terpenos e o radical fenoxila é inviabilizada termodinamicamente pela diferença marcante entre os potenciais redox das espécies envolvidas.

Não foi possível avaliar a reatividade dos flavonoides prenilados xantohumol e isoxantohumol pela metodologia empregada, uma vez que, pelo espectro de absorção eletrônica destes, verifica-se que os substratos supracitados absorvem na região de 280 a 440 nm e 260 a 360 nm, respectivamente¹¹⁴. No entanto, as demais flavanonas não se mostraram reativas frente ao radical aqui inserido. Desta forma, análogo ao exposto anteriormente, provavelmente as diferenças entre os potenciais de oxidação destes substratos e o potencial de redução do radical fenoxila são acentuadas; logo, a reação entre estes é inviável.

4. CONCLUSÕES

A partir das constantes de velocidade aparentes determinadas para as reações envolvendo o radical HER e as lupulonas, os terpenos, os flavonoides prenilados e os compostos contendo grupos tióis livre, constatou-se que estes substratos são prontamente oxidados na presença do radical HER. Observa-se que os ácidos amargos do lúpulo apresentam a maior reatividade frente ao radical HER, seguido pelos compostos contendo grupos tióis livre, flavonoides prenilados e terpenos.

Como produtos da reação envolvendo as lupulonas, foram identificados compostos contendo um grupo hidroxila ligados à cadeia lateral prenila, bem como compostos decorrentes da adição de uma molécula do radical HER na cadeia lateral. Estes compostos são decorrentes de reações de oxidação das lupulonas seguindo um mecanismo conduzido por espécies radicalares, tais como o radical HER e o radical hidroxila, na presença de traços de oxigênio e íons de metais de transição de Fe(II). Analogamente, foi identificado, como produtos majoritários formados na oxidação térmica dos terpenos, uma vasta gama de isômeros hidroxilados contendo uma molécula do radical hidroxila ligada à molécula do precursor inicial. Estes produtos foram propostos serem formados a partir de um mecanismo iniciado pelo radical HER, seguido por reações subsequentes envolvendo o oxigênio molecular, íons de metais de transição de Fe(II) e radicais hidroxila.

Por outro lado, para a reação envolvendo os flavonoides prenilados e o radical HER, verificou-se mecanismos de reação distintos para a chalcona xantohumol e para as flavanonas isoxantohumol, 6- e 8-prenilnaringenina. No primeiro caso, constatou-se a formação majoritária de três produtos, sendo dois destes isômeros posicionais contendo uma molécula do radical HER adicionado à molécula do precursor; ao passo que o terceiro produto apresentou duas moléculas do radical HER adicionada à molécula. Para a reação envolvendo o isoxantohumol, apenas um composto foi identificado, o qual apresentou uma molécula do

radical HER ligada à estrutura do precursor. De fato, a diferença na reatividade observada para estes compostos foi relacionada à presença da carbonila α,β -insaturada na molécula do xantohumol, a qual confere um sítio de reação adicional ao composto. O mecanismo de reação proposto para estes substratos resumem os processos de oxidação iniciados pela presença do radical HER, o qual abstrai um átomo de hidrogênio (bis)alílico da cadeia lateral prenila, bem como adiciona-se nucleofilicamente à carbonila α,β -insaturada na molécula do xantohumol.

Para a reação entre os compostos contendo grupos tióis livre e o radical HER constatou-se a formação do dissulfetos decorrentes da recombinação radicalar entre os radicais tiila. Contudo, não se observa reação envolvendo os ácidos amargos do lúpulo, os terpenos e as flavanonas 6- e 8-prenilnaringenina frente ao radical fenoxila. Logo, os resultados aqui apresentados contribuem para um maior entendimento sobre as principais vias de degradação oxidativa que estão inseridos na degradação térmica da cerveja.

Através da quantificação dos teores de tióis presentes e totais contidos em diferentes amostras de cerveja, bem como pela quantificação da concentração de proteínas presente na bebida, observa-se uma correlação direta entre os teores destes componentes e uma maior estabilidade térmica para as cervejas com maiores teores de proteínas e tióis reduzidos.

Quanto a oxidação lipídica desencadeada pelo radical HER, constatou-se que a reação é iniciada pela abstração dos átomos de hidrogênio (bis)alílicos dos metil ésteres derivados dos ácidos graxos poli-insaturados não-conjugados e pela transferência de átomo de hidrogênio alílico provindo dos esteróis para a espécie radicalar. Neste contexto, os isômeros hidroxilados foram identificados, como produtos decorrentes da oxidação primária dos metil ésteres de ácidos poli-insaturados.

Como um todo, considerando as características lipofílicas dos flavonoides prenilados, bem como o fato destes serem aptos à absorção e ao transporte através da parede intestinal,

conclui-se que os polifenóis prenilados podem, de fato, conferir um significativo efeito antioxidante no organismo humano, em especial no fígado, onde o radical HER reconhecidamente promove hepatotoxicidade. Assim, os prenilflavonoides podem prontamente proteger a membrana celular contra possíveis danos gerados pelo radical HER em consequência do consumo abusivo de bebidas alcóolicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTELMANN, D.; DEMMER, O.; DESMER, N.; HOFMANN, T. ^{18}O stable isotope labeling, quantitative model experiments, and molecular dynamics simulation studies on the trans-specific degradation of the bitter tasting iso- α -acids of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11014-11023, 2009.
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. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, p. 108-112, 2000.
4. BAMFORTH, C. W. Brewing and brewing research: past, present and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1371-1378, 2000.
5. DE KEUKELEIRE, D.; HUVAERE, K. Shining light on the photodecomposition of beer. **The Spectrum**, v. 18, p. 18-25, 2005.
6. DE COOMAN, L.; EVERAERT, E.; DE KEUKELEIRE, D. Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 145-150, 1998.
7. VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. **Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids**. Amsterdam: Elsevier, 1991. 417 p.
8. VAN CLEEMPOT, M.; CATTOOR, K.; DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1220-1230, 2009.
9. TEUBER, M.; SEHMALRECK, A. F. Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. **Archives of Microbiology**, v. 94, p. 159-171, 1973.
10. 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, p. 1489-1494, 2005.

11. 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**, v. 9, p. 4693-4699, 2003.
12. HAAS, G. J.; BARSOUMIAN, R. Antimicrobial activity of hop resins. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 59-61, 1994.
13. BLANCO, C. A.; ROJAS, A.; NIMUBONA, D. Effects of acidity and molecular size on bacteriostatic properties of beer hop derivatives. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 144-149, 2007.
14. SIMPSON, W. J.; SMITH, A. R. W. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 327-334, 1992.
15. ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 383-396, 2008.
16. SHEN, C.; SOFOS, J. N. Antilisterial activity of hops beta acids in broth with or without other antimicrobials. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 438-442, 2008.
17. SIRAGUSA, G. R.; HAAS, G. J.; MATTHEWS, P. D.; SMITH, R. J.; BUHR, R. J.; DALE, N. M.; WISE, M. G. Antimicrobial activity of lupulones against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 853-858, 2008.
18. CHIN, Y.; ANDERSON, H. H.; ALDERTON, G.; LEWIS, J. C. Antituberculosis activity and toxicity of lupulon for the mouse. **Experimental Biology and Medicine**, v. 70, p. 158-162, 1949.
19. MICHENER, H. D.; ANDERSEN, A. A. Protection of lupulon and humulon by ascorbic acid. **Science**, v. 110, p. 68-69, 1949.
20. RÜCKLE, L.; SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 108, p. 139-147, 2006.
21. KING, A. J.; DICKINSON, J. R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 53-62, 2003.

22. TAKOI, K.; KOIE, K.; ITOGA, Y.; KATAYAMA, Y.; SHIMASE, M.; NAKAYAMA, Y.; WATARI, J. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5050-5058, 2010.
23. ERI, S.; KHOO, B. K.; LECH, J.; HARTMAN, T. G. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus Lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1140-1149, 2000.
24. LAM, K. C.; FOSTER II, R. T.; DEINZER, M. L. Aging of hops and their contribution to beer flavor. **Journal of Food Chemistry**, v. 34, p. 763-770, 1986.
25. CALOGIROU, A.; LARSEN, B. R.; KOTZIAS, D. Gas-phase terpene oxidation products: a review. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 1423-1439, 1999.
26. BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 4518-4531, 2009.
27. WANG, G.; TIAN, L.; AZIZ, N.; BROUN, P.; DAI, X.; HE, J.; KING, A.; ZHAO, P. X.; DIXON, R. A. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. **Plant Physiology**, v. 148, p. 1254-1266, 2008.
28. KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KAGAMI, N.; KAWATSURA, K. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4701-4707, 2005.
29. GONZÁLEZ, M. F.; DI STEFANO, R.; BRIONES, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. **Food Microbiology**, v. 20, p. 35-41, 2003.
30. ROCHA, S. M.; COUTINHO, P.; DELGADILLO, I.; CORDOSO, A. D.; COIMBRA, M. A. Effect of enzymatic aroma release on the volatile compounds of White wines presenting different aroma potentials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 199-205, 2005.
31. MARAIS, J. Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 4, p. 49-58, 1983.

32. SKOLD, M.; BORJE, A.; HARAMBASIC, E.; KARLBERG, A. T. Contact allergens formed on air exposure of linalool: identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 1697-1705, 2004.
33. BACKTORP, C.; HAGVALL, L.; BORJE, A.; KARLBERG, A. T.; NORRBY, P. O.; NYMAN, G. Mechanism of air oxidation of the fragrance terpene geraniol. **Journal of Chemical Theory Computation**, v. 4, p. 101-106, 2008.
34. BACKTORP, C.; WASS, J. R. T. J.; PANAS, I.; SKOLD, M.; BORJE, A.; NYMAN, G. Theoretical investigation of linalool oxidation. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, p. 12204-12212, 2006.
35. GIL-RAMÍREZ, A.; MENDIOLA, J. A.; ARRANZ, E.; REÍZ-RODRÍGUEZ, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E.; MARÍN, F. R. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 54-60, 2012.
36. STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 65, p. 1317-1330, 2004.
37. STEVENS, J. F.; TAYLOR, A. W.; DEINZER, M. L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 832, p. 97-107, 1999.
38. INTELMANN, D.; HASELEU, G.; DUNKEL, A.; LAGEMANN, A.; STEPHAN, A.; HOFMANN, T. Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1939-1953, 2011.
39. GONÇALVES, J. L.; ALVEZ, V. L.; RODRIGUES, F. P.; FIGUEIRA, J. A.; CÂMARA, J. S. A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 42-51, 2013.
40. COLGATE, E. C.; MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; BRAY, T. M.; HO, E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. **Cancer Letters**, v. 246, p. 201-209, 2007.

41. KOO, J. H.; KIM, H. T.; YOON, H. Y.; KWON, K. B.; CHOI, I. W.; JUNG, S. H. Effects of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 40, p. 313-319, 2008.
42. CHOI, J. M.; KIM, H. J.; LEE, K. Y.; CHOI, H. J.; LEE, I. S.; KANG, B. Y. Increased IL-2 production in T cells by xanthohumol through enhanced NF-AT and AP-1 activity. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 103-107, 2009.
43. MENDES, V.; MONTEIRO, R.; PESTANA, D.; TEIXEIRA, D.; CALHAU, C.; AZEVEDO, I. Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: Implication on antiproliferative and apoptotic effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11631-11637, 2008.
44. GERHAUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1941-1954, 2005.
45. VANHOECKE, B.; DERYCKE, L.; MARCK, V. V.; DEPYPERE, H.; DE KEUKELEIRE, D.; BRACKE, M. Antiinvasive effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus Lupulus* L.) and beer. **International Journal of Cancer**, v. 117, p. 889-895, 2005.
46. MONTEIRO, R.; FARIA, A.; AZEVEDO, I.; CALHAU, C. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. **Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 105, p. 124-130, 2007.
47. CASASCHI, A.; MAIYOH, G. K.; RUBIO, B. W.; ADELI, K.; THERIAULT, A. G. The chalcones xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein b secretion in HepG2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1340-1346, 2004.
48. MILLIGAN, S.; KALITA, J.; POCKOCK, V.; HEYERICK, A.; DE COOMAN, L.; RONG, H. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen 8-prenylnaringenin. **Reproduction**, v. 123, p. 235-242, 2002.
49. ZHAO, F.; WATANABE, Y.; NOZAWA, H.; DAIKONNYA, A.; KONDO, K.; KITANAKA, S. Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 43-49, 2005.
50. JEONG HO, J.; JU SUN, K.; SAM SIK, K.; KUN HO, S.; HYUN WOOK, C.; HYUN PYO, K. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 589-595, 2010.

51. YOUNG-CHANG, C.; SUNG-KYUN, Y.; HYUN JUNG, K.; CHEONG-WEON, C.; IK-SOO, L.; BOK YUN, K. Xanthohumol inhibits IL-12 production and reduces chronic allergic contact dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 556-561, 2010.
52. MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; IVANOV, V.; McCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M. L.; BUHLER, D. R. Antioxidant and prooxidant actions of renylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3876-3884, 2000.
53. GERHAUSER, C.; ALT, A.; HEISS, E.; GAMAL-ELDEEN, A.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; NEUMANN, I.; SCHERF, H. R.; FRANK, N.; BARTSCH, H.; BECKER, H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 959-969, 2002.
54. HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M. C. Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 1-12, 1996.
55. ANDERSEN, M. L.; OUTTRUP, H.; SKIBSTED, L. H. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3106-3111, 2000.
56. CARNEIRO, J. R.; GUIDO, L. F.; ALMEIDA, P. J.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. The impact of sulphur dioxide and oxygen on the behavior of 2-furaldehyde in beer: in industrial approach. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 545-552, 2006.
57. VERMEULEN, C.; GIJS, L.; COLLIN, S. Sensorial contribution and formation pathways of thiols in food: a review. **Food Reviews International**, v. 21, p. 69-137, 2007.
58. KANEDA, H.; TAKASHIO, M.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S.; TAMAKI, T. Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, p. 115-120, 1996.
59. TAKASHIO, M.; SHINOTSUKA, K. Preventive production of beer against oxidation-recent advances in brewing technology. **Food Science and Technology International Tokyo**, v. 4, p. 169-177, 1998.
60. ROGERS, P., CLARKE, F. M. Sustainable redox power from beer proteins. In: EUROPEAN BREWERY CONVENTION CONGRESS, 31., 2007, Fachverlag Hans Carl. **Livro de resumos...** Nürnberg: European Brewery Society, 2007.

61. WU, M. J.; CLARKE, F. M.; ROGERS, P. J.; YOUNG, P.; SALES, N.; O'DOHERTY, P.; HIGGINS, V. Identification of a protein with antioxidant activity that is important for the protection against beer ageing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 6089-6103, 2011.
62. LUND, M. N.; ANDERSEN, M. Detection of thiol groups in beer and their correlation with oxidative stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, p. 163-169, 2011.
63. PERROCHEAU, L. P.; ROGNIAUX, H.; BOIVIN, P.; MARION, D. Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. **Proteomics**, v. 5, p. 2849-2858, 2005.
64. CHARVOLIN, D.; DOULIEZ, J. P.; MARION, D.; COHEN-ADDAD, C.; PEBAY-PEYROULA, E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 562-568, 1999.
65. HEINEMANN, B.; ANDERSEN, K. V.; NIELSEN, P. R.; BECH, L. M.; POULSEN, F. M. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. **Protein Science**, v. 5, p. 13-23, 1996.
66. PERROCHEAU, L.; BAKAN, B.; BOIVIN, P.; MARION, D. Stability of barley and malt lipid transfer protein 1 (LTP1) toward heating and reducing agents: relationships with the brewing process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3108-3113, 2006.
67. STOYANOVSKY, D. A.; WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and α -tocopherol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 132-138, 1998.
68. KREITMAN, G. Y.; LAURIE, V. F.; ELIAS, R. J. Investigation of ethyl radical quenching by phenolics and thiols in model wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 685-692, 2013.
69. ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1272-1275, 1998.
70. ELIAS, R. J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H.; WATERHOUSE, A. L. Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin-trapping. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4359-4365, 2009.

71. BARREIRO, J. C.; CAPELATO, M. D.; MARTIN-NETO, L.; HANSEN, H. C. B. Oxidative decomposition of atrazine by a fenton-like reaction in a H₂O₂/ferrihydrite system. **Water Research**, v. 41, p. 55-62, 2007.
72. VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357-381, 2006.
73. MARFAK, A.; TROUILLAS, P.; ALLAIS, D. P.; CALLISTE, C. A.; COOK-MOREAU, J.; DUROUX, J. Reactivity of flavonoids with 1-hydroxyethyl radical: a γ -radiolysis study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1670, p. 28-39, 2004.
74. CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Phenol and terpene quenching of singlet and triplet excited status of riboflavin in relation to light-struck flavor formation in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5630-5636, 2006.
75. FLORIDI, S.; MONTANARI, L.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1548-1554, 2003.
76. MOORE, D. R.; REINKE, L. A.; McCAY, P. B. Metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals *in vivo*: detection with intravenous administration of α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-*t*-butylnitron. **Molecular Pharmacology**, v. 47, p. 1224-1230, 1995.
77. RAO, D. N. R.; YANG, M. X.; LASKER, J. M.; CEDERBAUM, A. I. 1-Hydroxyethyl radical formation during NADPH- and NADH- dependent oxidation of ethanol by human liver microsomes. **Molecular Pharmacology**, v. 49, p. 814-821, 1996.
78. ALBANO, E.; FRENCH, S. W.; INGLEMAN-SUNDBERG, M. Hydroxyethyl radical in ethanol hepatotoxicity. **Frontier in Bioscience**, v. 4, p. 533-540, 1999.
79. REIKE, L. A.; LAI, E. K.; DUBOSE, C. M.; McCAY, P. B. Reactive free radical generation *in vivo* in heart and liver of ethanol-fed rats: correlation with radical formation *in vitro*. **Medical Sciences**, v. 84, p. 9223-9227, 1987.
80. REINKE, L. A.; KOTAKE, Y.; McCAY, P. B.; JANZEN, E. G. Spin-trapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: *in vivo* detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN. **Free radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 31-39, 1991.

81. PAVLISHCHUK, V. V.; ADDISON, A. W. Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25 °C. **Inorganica Chimica Acta**, v. 298, p. 97-102, 2000.
82. POULSEN, S.; RAMOS, C. L.; GLADWELL, T.; RENKS, E.; CENTRA, M.; YOUNG, D.; CAHEN, M. S.; ROSEN, G. M. A kinetic approach to the selection of a sensitive spin trapping system for the detection of hydroxyl radical. **Analytical Biochemistry**, v. 217, p. 76-83, 1994.
83. CARLSEN, C. U.; SKOVGAARD, M.; SKIBSTED, L. H. Pseudoperoxidase activity of myoglobin: kinetics and mechanism of the peroxidase cycle of myoglobin with H₂O₂ and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5815-5823, 2003.
84. OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D. C.; SOARES NETTO, L. E.; OHARA, A. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 326-334, 2007.
85. WINTERBOURN, C. C. The ability of scavengers to distinguish OH[•] production in the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction: comparison of four assays for OH[•]. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, p. 33-39, 1987.
86. CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids towards triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6602-6606, 2004.
87. HUYVAERE, K.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation of tryptophan and histidine. Reactivity of aromatic N-heterocycles toward triplet-excited flavins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 8049-8060, 2009.
89. ABRAHAMSSON, V.; HOFF, S.; NIELSEN, N. J.; LIND, M. N.; ANDERSEN, M. L. Determination of sulfite in beer based on fluorescent derivatives and liquid chromatographic separation. **American Society of Brewing Chemists**, v. 70, p. 296-302, 2012.
90. HANSEN, R. E.; WINTHER, J. R. An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: reactions, reagents, and practical considerations. **Analytical Biochemistry**, v. 394, p. 147-158, 2009.

91. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
92. UCHIDA, M.; SUGA, S.; ONO, M. Improvement for oxidation flavor stability of beer – rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, p. 205-211, 1996.
93. WU, C. R.; HUANG, M. Y.; LIN, Y. T.; JU, H. Y. CHING, H. Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1464-1471, 2007.
94. MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of parallel electron transfer from β -carotene to phenoxyl radical and adduct formation between phenoxyl radical and β -carotene. **Free Radical Research**, v. 25, p. 515-523, 1996.
95. DE ALMEIDA, N. E. C.; HOMEM-DE-MELLO, P.; DE KEUKELEIRE, D.; CARDOSO, D. R. Reactivity of beer bitter acids towards the 1-hydroxyethyl radical as probed by spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR) and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4183-4191, 2011.
96. KOPPENOL, W. H.; BUTLER, J. Energetics of interconversion reactions of oxyradicals. **Advances in Free Radical Biology and Medicine**, v. 1, p. 91-131, 1985.
97. KAO, D.; CHAINTREAU, A. LEPOITTEVIN, J. P.; GIMÉNEZ-ARNAU, E. Synthesis of allylic hydroperoxides and EPR spin-trapping studies on the formation of radicals in iron system as potential initiators of the sensitizing pathway. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 6188-6200, 2011.
98. KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNJOVA, L.; JELEN, F. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 19-24, 2004.
99. ATKINS, P.; JONES, L. In. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001. 914 p.
100. LENGYEL, J.; RIMARCIK, J.; VAGANEK, A.; FEDOR, J.; LUKES, V.; KLEIN, E. Oxidation of sterols: Energetics of C-H and O-H bond cleavage. **Food Chemistry**, v. 133, p.1435-1440, 2012.

101. AGAPITO, F.; NUNES, P. M.; CABRAL, B. J. C.; SANTOS, R. M. B.; SIMOES, J. A. M. Energetics of the allyl group. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 8770-8779, 2007.
102. HUVAERE, K.; CARDOSO, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; WESTERMANN, S.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 5583-5593, 2010.
103. CARDOSO, R. C.; SCURACHIO, R. S.; SANTOS, W. G.; HOMEM-DE-MELLO, P.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin-photosensitized oxidation is enhanced by conjugation in unsaturated lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2268-2275, 2013.
104. XU, L.; DAVIS, T. A.; PORTER, N. A. Rate constants for peroxidation of polyunsaturated fatty acids and sterols in solution and in liposomes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 13037-13044, 2009.
105. PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, p. 277-290, 1995.
106. YING, H.; PORTER, N. A. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7, p. 170-184, 2005.
107. BRASH, A. R. Autoxidation of methyl linoleate: identification of the bis-allylic 11-hydroperoxide. **Lipids**, v. 35, p. 947-952, 2000.
108. KHATIB, A.; WILSON, E. G.; KIM, H. K.; SUPARDI, M.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR assignment of iso- α -acids from isomerized extracts of *Humulus lupulus* L. cones. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 371-377, 2007.
109. STEINHAUS, M.; FRITSCH, H. T.; SCHIEBERLE, P. Quantification of (R)- and (S)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7100-7105, 2003.
110. KARLIN, K. D. **Progress in inorganic chemistry**. New York: Wiley, 2004. 517 p.
111. NETA, P.; GRODKOWSKI, J. Rate constants for reaction of phenoxyl radicals in solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 34, p. 109-199, 2005.

112. DAS, P. K.; ENCINAS, M. V.; SCAIANO, J. C. Laser flash photolysis study of the reactions of carbonyl triplets with phenols and photochemistry of p-hydroxypropiophenone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 4154-4162, 1981.

113. LIND, J.; SHEN, X.; ERIKSEN, T. E.; MERÉNYI, G. The one-electron reduction potential of 4-substituted phenoxyl radicals in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 479-482, 1990.

114. DHOOGHE, L.; NAESSENS, T.; HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D.; VLIETINCK, A. J.; PIETERS, L.; APERS, S. Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. **Talanta**, v. 83, p. 448-456, 2010.

Apêndice A

Primeiramente, assume-se que os processos cinéticos das reações abaixo (1 e 2) são majoritários durante a captação do radical HER.

Pode-se assumir as seguintes equações no consumo do radical HER:

$$-\frac{d[\text{H}_3\text{CH}\dot{\text{C}}\text{OH}]}{dt} = k_2 * [\text{4-POBN}] * [\text{H}_3\text{CH}\dot{\text{C}}\text{OH}] \quad (3)$$

$$-\frac{d[\text{H}_3\text{CH}\dot{\text{C}}\text{OH}]}{dt} = k_2' * [\text{IAA}] * [\text{H}_3\text{CH}\dot{\text{C}}\text{OH}] \quad (4)$$

Quando a captação do radical pelos substratos é igual a 50% tem-se que as taxas de consumo do radical HER (3) e (4) se igualam. Logo, a equação abaixo pode ser escrita, a qual expressa a relação entre as constantes de velocidade das duas reações envolvidas (k_2 e k_2').

$$k_2 * [\text{4-POBN}] = k_2' * [\text{SUBSTRATO}]$$

Esta equação pode ser generalizada para qualquer percentual de captação do radical:

$$\left(\frac{F}{1 - F} \right) * k_2 * [\text{4-POBN}] = k_2' * [\text{SUBSTRATO}]$$

Assim, a porcentagem de captação do radical (F) é obtida através do experimento de controle, o qual apresenta um sinal analítico referente do aduto radical $[\text{4-POBN/CH(CH}_3\text{)OH}]^\bullet$, e de experimentos variando a concentração de substratos, no qual verifica-se uma redução do sinal analítico referente ao aduto radical.

Apêndice B

Figura B1. Alargamento (417 – 419 m/z) do espectro de massas (*orbitrap HESI-II-FT-MS*) da mistura reacional entre os β -ácidos e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação.

Figura B2. Alargamento (430,8 – 432,6 m/z) do espectro de massas (*orbitrap HESI-II-FT-MS*) da mistura reacional entre os β -ácidos e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação.

Figura B3. Alargamento (445,2 – 446,6 m/z) do espectro de massas (*orbitrap HESI-II-FT-MS*) da mistura reacional entre os β -ácidos e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação.

Figura B4. Alargamento (459,3 – 460,3 m/z) do espectro de massas (*orbitrap HESI-II-FT-MS*) da mistura reacional entre os β -ácidos e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação.

Figura B5. Alargamento (460,5 – 462,5 m/z) do espectro de massas (*orbitrap HESI-II-FT-MS*) da mistura reacional entre os β -ácidos e o radical HER, sob atmosfera de Ar, a $25,0 \pm 0,2$ °C, 1 min de reação.