

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ HENRIQUE IAGUSZESKI PIZONE

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CERVEJA ARTESANAL ESTILO
AMERICAN BLONDE ALE, INCORPORADA COM EXTRATO DAS FOLHAS DE
Monteverdia ilicifolia (Mart. Ex Reissek) Biral**

PATO BRANCO

2022

LUIZ HENRIQUE IAGUSZESKI PIZONE

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CERVEJA ARTESANAL ESTILO
AMERICAN BLONDE ALE, INCORPORADA COM EXTRATO DAS FOLHAS DE
Monteverdia ilicifolia (Mart. Ex Reissek) Biral**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF AN AMERICAN STYLE BLONDE
ALE CRAFT BEER INCORPORATED WITH LEAF EXTRACT OF *Monteverdia*
ilicifolia (Mart. Ex Reissek) Biral**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Mário Antônio Alves da Cunha.

Coorientador(a): Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

Pato Branco

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Departamento de Química
Curso de Bacharelado em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CERVEJA ARTESANAL ESTILO AMERICAN BLONDE ALE, INCORPORADA COM EXTRATO DAS FOLHAS DE *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral

por

Luiz Henrique Iaguszkeski Pizone

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 08 de dezembro de 2022 às 10 horas e 00 minutos como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **Aprovado**.

Mário Antônio Alves da Cunha
Orientador

Oerves Martinez Castro
Membro Titular

Edilson da Silva Ferreira
Membro Titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.058800/2022-94 documento 3140341

Dedico este trabalho as minhas três
sobrinhas Antonella, Florença e Catarina
que são as principais fontes de toda
minha inspiração e motivação.

AGRADECIMENTOS

São poucos parágrafos para expor minha imensa gratidão a todas as pessoas que fizeram parte dessa fase importante da minha vida. Portanto, antecipo meu pedido de desculpas àquelas que não estarão presentes entre essas palavras, mas estejam certos de que fazem parte do meu pensamento.

Primeiramente agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais Glademir Pizone e Idolene Fátima Iaguszkeski Pizone e as minhas irmãs Camila Iracema Pizone e Marcela Pizone, por todo o suporte e o incentivo durante toda a trajetória da minha graduação. Agradeço também a minha namorada Leticia Laura do Rosário por toda a ajuda direta e indireta dada para realização do meu trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha e coorientadora Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, por todo o conhecimento compartilhado e construído durante os anos de faculdade. Estendo também este agradecimento, a todos os professores do curso de Química da UTFPR campus Pato Branco e a todos os outros professores e mestres com quem tive a honra e o prazer de aprender.

Sou grato aos meus amigos e colegas de turma por tornarem o período da graduação mais leve e divertido e aos meus amigos do ramo cervejeiro, em especial ao Eduardo de Souza Blonkoski que me ensinou e despertou em mim o interesse pela fabricação da cerveja artesanal.

Agradeço a Inplasul Indústria de Plásticos Sudoeste e a meus colegas de trabalho pelo apoio dado a minha pesquisa e a todos que, por algum motivo, contribuíram para a realização deste trabalho.

" Not all chemicals are bad. Without chemicals such as hydrogen and oxygen, for example, there would be no way to make water, a vital ingredient in beer. " Dave Barry

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e sua popularidade vem crescendo nos últimos anos, especialmente a das cervejas artesanais cujos os inúmeros estilos e tipos têm conquistado o mercado. Os diferentes processos de produção da cerveja e as tecnologias envolvidas possibilitam uma enorme quantidade de formulações, incluindo a produção de cervejas acrescidas de diferentes insumos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de uma cerveja artesanal estilo *American Blonde Ale* enriquecida com extrato de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral. Esta planta é popularmente conhecida no Brasil como espinheira-santa e é rica em flavonóides, taninos e triterpenos, os quais têm propriedades antioxidantes, cicatrizantes e protetoras gástricas. A bebida foi produzida de forma artesanal usando um sistema de fogareiros tribloco na etapa de brassagem. Foram utilizados os maltes pilsen Agrária e Blumenauer, lúpulo peletizado (T-90) Cascade e levedura *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-04 de alta fermentação. A fermentação foi conduzida em bombona de fermentação com *airlock* a 20 °C por 7 dias. As cervejas produzidas foram caracterizadas quanto aos parâmetros de qualidade: Cor (EBC), amargor (IBU), teor alcoólico (ABV), pH final, extrato real, extrato original, extrato aparente, teor de matéria inorgânica (cinzas), estabilidade da espuma, compostos fenólicos, fenólicos totais e potencial antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. A cerveja controle e a cerveja com a adição do extrato vegetal apresentaram os seguintes parâmetros físico-químicos: Cor (10,33 e 9,60 EBC), amargor (24,05 e 20,85 IBU), teor alcoólico (5,21 e 5,18 ABV), pH final (4,57 e 4,43), extrato real (5,02 e 4,82 °Plato), extrato aparente (2,32 e 2,40 °Plato), extrato original (12,21 e 13,43 °Plato), teor de matéria inorgânica (0,18 e 0,16 %), estabilidade da espuma (78,99 e 81,48 %). A adição do extrato vegetal promoveu o aumento do conteúdo de fenólicos totais (365,99 mg GAE/L) e compostos polifenólicos totais (248,73 mg mg/L) da cerveja. Entre os compostos bioativos, os conteúdos dos flavonóides catequina (25,63 mg/L) e epicatequina (15,09 mg/L) e do ácido cafeico (0,88 ± mg/L) foram potencializados com a adição do extrato. Da mesma forma, a adição do extrato potencializou a capacidade de captura do radical ABTS e DPPH em 40% e 14,71%, respectivamente. Da mesma forma, o poder antioxidante redutor do íon férrico melhorou em 40,36%. A adição do extrato de *Monteverdia ilicifolia* à bebida promoveu seu enriquecimento em compostos fenólicos com propriedades biológicas e a potencialização de sua capacidade antioxidante. A utilização do extrato de *M. ilicifolia* na produção de cervejas enriquecidas com compostos bioativos apresenta-se tecnicamente viável e possibilita uma inovação no mercado de cervejas especiais.

Palavras-chave: Antioxidante; Espinheira-santa; Extrato vegetal; Fermentação.

ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages in the world, and its popularity has been growing in recent years, especially craft beers, whose numerous styles and types have conquered the market. The different beer production processes and the technologies involved allow a large number of formulations, including the production of beers with different inputs. In this context, the present work aimed at the production and characterization of an American Blonde Ale style craft beer enriched with *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral extract. This plant popularly known in Brazil as *espinheira-santa* is rich in flavonoids, tannins, and triterpenes, which have antioxidant, healing, and gastric protective properties. The beverage was produced in an artisanal way using a triblock stove system in the mashing stage. Agrária and Blumenauer pilsner malts, Cascade T-90 pelletized hops, and *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-04, a high-fermentation yeast, were used in brewing. Fermentation was carried out in a fermentation tank with airlock at 20 °C for 7 days. The beers produced were characterized according to the quality parameters: Color (EBC), bitterness (IBU), alcohol content (ABV), final pH, real extract, original extract, apparent extract, inorganic matter (ash) content, foam stability, phenolic compounds, total phenolics content, and antioxidant potential by the ABTS, DPPH and FRAP antioxidant methods. The control beer and the beer with the addition of plant extract showed the following respective physicochemical parameters: Color (10.33 and 9.60 EBC), bitterness (24.05 and 20.85 IBU), alcohol content (5.21 and 5.18 ABV), final pH (4.57 and 4.43), real extract (5.02 and 4.82 °Plato), apparent extract (2.32 and 2.40 °Plato), original extract (12.21 and 13.43 °Plato), inorganic matter content (0.18 and 0.16 %), foam stability (78.99 e 81.48 %). The content of total phenolic (365.99 mg GAE/L) and total polyphenolic compounds (248.73 mg GAE/L) increased after addition of the plant extract. Among the bioactive compounds, the contents of the flavonoids catechin (25.63 mg/L), epicatechin (15.09 mg/L) and caffeic acid (0.88 mg/L) increased with the addition of the plant extract. The addition of the plant extract potentiated the ABTS and DPPH radical scavenging capacity by 40% and 14.71%, respectively. Similarly, the ferric reducing antioxidant power improved by 40.36%. The addition of *M. ilicifolia* extract enriched the beverage in phenolic compounds possessing biological properties and accompanied by an enhancement in antioxidant capacity. The use of *M. ilicifolia* extract in the production of beers enriched with bioactive compounds is technically feasible and enables innovation in the beer specialty market.

Keywords: Antioxidant; Espinheira-santa; Plant extract; Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Malte Pilsen Belga BWS não moído.....	18
Figura 2 - Estrutura química dos α e β -ácidos presentes no lúpulo	19
Figura 3 - Lúpulo Tradition Hallertau em pellets.....	20
Figura 4 - Fluxograma básico do processo de fabricação da cerveja artesanal	23
Figura 5 - Estrutura básica dos compostos fenólicos	25
Figura 6 - Fluxograma do processo de fabricação da cerveja elaborada no presente trabalho	29
Figura 7 - Perfil cromatográfico das amostras.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil dos teores (mg/L) de minerais na água dos principais centros cervejeiros do mundo	17
Tabela 2 - Perfil da composição das folhas secas de lúpulo.....	20
Tabela 3 - Principais compostos químicos encontrados nas folhas de <i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. Ex. Reissek) Biral.....	24
Tabela 4 - Parâmetros vitais das cervejas American Blonde Ale e das cervejas produzidas	36
Tabela 5 - Compostos bioativos presentes no extrato liofilizado das folhas de <i>M. ilicifolia</i> , na cerveja controle e na cerveja + EV*	38
Tabela 6 - Quantidade de fenólicos e polifenóis totais encontrados para as cervejas elaboradas	39
Tabela 7 - Atividade antioxidante das cervejas elaboradas.....	40
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos das cervejas elaboradas	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6 ácido sulfônico
ABV	<i>Alcohol By Volume</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BJCP	<i>Beer Judge Certification Program</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EA	Extrato Aparente
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
EO	Extrato Original
Eq. FeSO ₄	Equivalente de Sulfato Ferroso
ER	Extrato Real
FG	<i>Final Gravity</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GAE	<i>Gallic Acid Equivalent</i>
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mAU	Mili Unidades de Absorbância
OG	<i>Original Gravity</i>
SG	<i>Specific Gravity</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	DESENVOLVIMENTO	14
2.1	Referencial teórico	14
2.1.1	Definição e histórico da bebida.....	14
2.1.2	Mercado brasileiro de cervejas.....	15
2.1.3	Insumos da produção de cerveja.....	16
<u>2.1.3.1</u>	<u>Água</u>	<u>16</u>
<u>2.1.3.2</u>	<u>Malte</u>	<u>17</u>
<u>2.1.3.2.1</u>	<u>Cevada</u>	<u>18</u>
<u>2.1.3.3</u>	<u>Lúpulo</u>	<u>19</u>
<u>2.1.3.4</u>	<u>Levedura</u>	<u>21</u>
<u>2.1.3.4.1</u>	<u>Cervejas do tipo Ale e Lager</u>	<u>21</u>
2.1.4	A cerveja artesanal.....	22
2.1.5	<i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. Ex Reissek) Biral	23
2.1.6	Compostos fenólicos e atividade antioxidante	25
2.2	Material e métodos	26
2.2.1	Coleta e preparo do extrato das folhas de <i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. Ex Reissek) Biral	26
2.2.2	Elaboração da cerveja artesanal	26
2.2.3	Mosturação, fervura e resfriamento	27
2.2.4	Inoculação, fermentação e maturação.....	27
2.2.5	Carbonatação, envase e pasteurização	28
2.3	Caracterização físico-química das cervejas	29
2.3.1	Análise de cor (unidades EBC).....	30
2.3.2	Determinação do teor alcoólico em volume (ABV).....	30
2.3.3	Unidades de amargor (IBU).....	31
2.3.4	pH final	31
2.3.5	Estabilidade de espuma	31
2.3.6	Extratos primitivo, real e aparente	32
2.3.7	Fenólicos totais.....	33
2.3.8	Polifenólicos totais.....	33
2.3.9	Determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência.....	34

SUMÁRIO

2.3.10	Determinação da atividade antioxidante.....	34
<u>2.3.10.1</u>	<u>Sequestro do radical do ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6 ácido sulfônico)</u>	<u>34</u>
<u>2.3.10.2</u>	<u>Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)</u>	<u>35</u>
<u>2.3.10.3</u>	<u>Poder antioxidante redutor do íon férrico (FRAP)</u>	<u>35</u>
2.3.11	Análise estatística.....	36
2.4	Resultados e discussões	36
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A Cerveja é uma bebida milenar, obtida por meio da fermentação alcoólica do mosto de cereais maltados com adição de lúpulo, sendo possível ainda, a incorporação de outros extratos e especiarias, a fim de despertar características sensoriais novas ou ainda potencializar atributos da bebida, desde que não ultrapassem 45% em peso o extrato primitivo da mesma (Brasil, 2019). A cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis, os quais são moléculas bioativas benéficas ao organismo. Tais compostos podem ser oriundos tanto do malte, quanto do lúpulo ou dos demais adjuntos adicionados à bebida (CARVALHO; CURTO; GUIDO, 2015; CHEIRAN *et al.*, 2019; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019). A presença de álcool na bebida (3 a 8% v/v) pode contribuir à absorção dos polifenóis, potencializando a capacidade antioxidante desses no plasma sanguíneo. Há ainda uma relação entre o consumo moderado de cerveja e a redução de riscos de doenças cardiovasculares e redução do estresse por conta do efeito relaxante do álcool (ASCENSIÓN *et al.*, 2021). No aspecto nutricional, pode ser destacada a presença de proteínas, minerais e vitaminas do complexo B, responsáveis principalmente por aumentar a capacidade imunológica e prevenir algumas doenças neurológicas (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2012).

Um dos principais problemas de qualidade relacionado a cerveja são as alterações químicas que ocorrem na bebida. Ésteres, aldeídos, dicetonas vicinais, ácidos orgânicos, álcoois superiores, fenóis e iso- α ácidos são compostos muito presentes na bebida. Por ser rica nessas moléculas, a cerveja é quimicamente instável e suscetível a reações com outras substâncias, originando compostos secundários, muitas vezes indesejáveis, que acabem alterando as características sensoriais esperadas da bebida. Essas transformações químicas ocorrem durante as etapas de fabricação e armazenamento prolongado da bebida, sendo a oxidação o mais comum desses processos. O oxigênio gasoso (O_2) é capaz de oxidar os compostos presentes na cerveja, modificando-os e revelando características sensoriais diferentes, quase nunca satisfatórias ou agradáveis, essa é uma adversidade que a indústria cervejeira busca solucionar (SIQUEIRA, P. BOLINI, H. MACEDO, 2008; VANDERHAEGEN *et al.*, 2006).

É importante destacar o acelerado crescimento dessa indústria em todo o Brasil, sendo registradas mais de 200 novas cervejarias no ano de 2020, além da

bebida continuar liderando o número de registros no MAPA e atingir à marca de 33.963 rótulos no mesmo ano (BRASIL, 2021).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma cerveja artesanal do tipo American Blonde Ale, enriquecida com extrato liofilizado das folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral. *Monteverdia ilicifolia*, popularmente conhecida no Brasil como espinheira-santa, uma planta tradicionalmente usada para alívio gastrointestinal, rica em compostos bioativos e antioxidantes e já reconhecida como fitoterápico pela Anvisa (ANVISA, 2021). A adição do extrato vegetal a bebida objetivou seu enriquecimento com compostos fenólicos e polifenólicos com propriedades biológicas e atividade antioxidante benéficas a saúde.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Referencial teórico

2.1.1 Definição e histórico da bebida

Segundo a legislação Brasileira, cerveja é uma bebida alcoólica resultante da fermentação realizada por leveduras cervejeiras no mosto do malte de cereais ou do extrato deste material, adicionada de lúpulo ou extrato de lúpulo. É permitida a substituição parcial do malte, por cereais não maltados e carboidratos de origem vegetal, sem que a bebida deixe de ser classificada como cerveja, sendo estes denominados “adjuntos cervejeiros”. Extratos de plantas, frutos, grãos, entre outros, também são permitidos, desde que constem como ingrediente na rotulagem do produto (Brasil, 2019).

A cerveja é uma das bebidas mais antigas conhecida pela humanidade, sendo até mesmo relacionada ao surgimento da agricultura e sendo seu nome derivado da divindade romana Ceres, deusa dos grãos, das colheitas e da fertilidade. Cerevisia, palavra latina oriunda do gaulês, foi o termo antecessor da palavra cerveja, como conhecemos hoje. A origem da bebida não é bem definida e inúmeros estudos também associam a descoberta do pão à produção de cerveja, devido a esses alimentos exibirem ingredientes semelhantes em seus preparos. É sugerido que uma das primeiras versões deste fermentado tenha ocorrido na região da Mesopotâmia, onde a cevada crescia em estado selvagem, há cerca de 8.000 anos (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983; CABRAS; HIGGINS, 2016). Segundo Wang et al. (2016), com

base nas análises de amido, fitólitos e resíduos químicos de vasos cerâmicos chineses, datados de mais de 5.000 anos atrás, foi possível identificar um subproduto da fermentação da cerveja produzida com milho-gigante, cevada e lágrimas de Jó, indicando um processo parecido com o utilizado na atualidade. Evidências em escrituras antigas apontam que os babilônios foram os primeiros responsáveis por desenvolver e aprimorar a técnica da produção de cerveja, classificando-as em estilos diferentes, baseado no teor de malte utilizado e na “força” da cerveja. O código Hamurabi, um dos conjuntos de leis mais antigo que se tem conhecimento, contém determinações específicas para a fabricação da cerveja na época, com punições extremamente rigorosas aos adulterantes da bebida (EßLINGER; NARZISS, 2009).

O lúpulo só foi incorporado à bebida na idade média pelos cervejeiros germânicos da época, por volta do século XIII, o que trouxe à bebida o amargor responsável por equilibrar o dulçor proveniente do malte. Séculos depois, também na Alemanha, foi promulgada a *Reinheitsgebot*, a Lei da Pureza, criada pelo duque Guilherme IV da Baviera. A Lei da Pureza ordenava que a cerveja deveria ser fabricada única e exclusivamente com água, malte de cevada e lúpulo, sendo esse um dos mais antigos decretos alimentares da Europa (BEHRE, 1999).

No Brasil, a cerveja foi inicialmente introduzida pelos holandeses durante o período da ocupação de Pernambuco, por volta de 1640, onde uma cervejaria chegou a ser construída no Recife. Quando os holandeses foram retirados do território brasileiro, a produção cervejeira se perdeu por mais de um século, devido à cultura do vinho trazida pelos portugueses e também pelo consumo de outras bebidas como a cachaça e a gengibirra, já consolidadas na colônia. Após esse esquecimento, a cultura cervejeira renasceu em 1808 com a vinda da família real portuguesa ao nosso país e desde então, o consumo e produção da bebida em terras brasileiras só aumentou. Em 1888 surgiram a Companhia Antártica Paulista e a Manufatura de Cerveja Brahma Villiger e Companhia, as quais 111 anos depois, viriam a se tornar a Ambev - Companhia de bebidas das Américas, atualmente a maior cervejaria do mundo (DE VARGAS GIORGI, 2016).

2.1.2 Mercado brasileiro de cervejas

Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - CervBrasil (2016), até 2016 o Brasil era o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com cerca de 14 bilhões de litros produzidos anualmente. Essa imensa cadeia é responsável por cerca

de 1,6% de todo o PIB nacional e emprega mais de 2 milhões de brasileiros. Contrariamente à comum concentração de mercado promovida pelas grandes cervejarias, micro empresas desse ramo vem surgindo cada vez mais no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Essas pequenas cervejarias prezam especialmente pela qualidade do produto, buscando oferecer ao público uma cerveja com características particulares, levando a “*Reinheitsgebot*” (lei da pureza Alemã), na maioria das vezes, como uma regra de produção (CERVIERI JÚNIOR *et al.*, 2014). No ano de 2020, 200 novas cervejarias surgiram no país, o que representa mais de uma nova cervejaria abrindo as portas a cada dois dias, demonstrando a grande importância da bebida na economia brasileira. Também no ano de 2020 a bebida, que já era líder de registros no MAPA, alcançou a marca de 35.741 registros válidos em todo o país, apresentando uma média de mais de 23 registros de produto por cervejaria. Esse crescimento demonstra-se mais modesto, porém, contínuo para os próximos anos, essa dormência pode ser explicada pelo elevado crescimento observado no setor nos últimos 20 anos, (3678%). Considerando o crescimento observado no último ano, é esperado um aumento de até 40% no número de estabelecimentos cervejeiros nos próximos três anos (BRASIL, 2021).

2.1.3 Insumos da produção de cerveja

2.1.3.1 Água

A água é o ingrediente presente em maior quantidade na cerveja, correspondendo a mais de 90% da composição em massa da bebida, evidenciando a importância das propriedades da mesma para uma cerveja final de qualidade. É imprescindível que a água utilizada seja potável, incolor, inodora e insípida para a produção de qualquer estilo de cerveja, no entanto, algumas características de águas diferentes, encontradas ao redor do mundo, trazem particularidades e um sabor único a cada cerveja. Segundo Palmer (2006), "a água "leve" de Pilsen (Rep. Tcheca), a água "dura" de Burton, nas terras médias (Inglaterra), e a água pura de fontes das Montanhas Rochosas (EUA) são alguns exemplos famosos da influência da água na cerveja de regiões distintas. Ainda que faça parte da identidade de alguns estilos, a presença de muitos minerais na água não é interessante do ponto de vista da obtenção do açúcar do malte, pois esses minerais podem afetar a conversão do amido em açúcares fermentáveis, diminuindo o teor alcoólico da bebida, além de poderem

alterar o sabor da mesma, trazendo "*off-flavors*", ou seja, sabores indesejáveis para a cerveja. Na Tabela 1 estão descritos os teores de alguns minerais encontrados na água dos principais centros cervejeiros do mundo.

Tabela 1 - Perfil dos teores (mg/L) de minerais na água dos principais centros cervejeiros do mundo

Cidade	Cálcio (Ca ²⁺)	Magnésio (Mg ²⁺)	Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	Sulfato (SO ₄ ²⁻)	Sódio (Na ⁺)	Cloro (Cl ⁻)	Estilo
Pilsen	10	3	3	4	3	4	<i>Pilsener</i>
Dortmund	225	40	22	120	60	60	<i>Export Lager</i>
Viena	163	68	24	216	8	39	<i>Vienna Lager</i>
Munique	109	21	17	79	2	36	<i>Oktoberfest</i>
Londres	52	32	10	32	86	34	<i>British Bitter</i>
Edimburgo	100	18	16	105	20	45	<i>Scottish Ale</i>
Burton	352	24	32	820	44	16	<i>India Pale Ale</i>
Dublin	118	4	319	54	12	19	<i>Dry Stout</i>

Fonte: Palmer (2006).

O pH é outro parâmetro fundamental e que deve ser controlado na água utilizada para a fabricação da cerveja, pois um pH mais alcalino pode promover a dissolução de espécies indesejáveis, presentes nos grãos de malte. O ideal é que o pH da água utilizada seja neutro ou levemente ácido (4 a 6.5), o que facilita a atividade das enzimas α e β -amilases que atuam na quebra do amido (BIAZUS *et al.*, 2009).

2.1.3.2 Malte

O malte (Figura 1) é o segundo ingrediente em maior quantidade na fabricação da cerveja, e é desse cereal que são extraídos os açúcares utilizados como substrato para as leveduras na etapa de fermentação da bebida. O malte é um produto obtido por um processo de umidificação e germinação controlada de cereais, como: cevada, milho, trigo, centeio, aveia, entre outros, denominado malteação. Esse processo tem o propósito de sintetizar e ativar enzimas α e β -amilases, pouco presentes nos grãos não maltados e transformar outros compostos, como amidos e proteínas. O malte de cevada é o mais utilizado para a fabricação da cerveja, pois este apresenta menores

dificuldades técnicas em sua obtenção, alto teor de amido, além de proteínas em quantidade suficiente para todos os processos bioquímicos e formação da espuma (MÄKINEN; ARENDT, 2015; RANI; BHARDWAJ, 2021).

Figura 1 - Malte Pilsen Belga BWS não moído



Fonte: Autoria própria (2020).

2.1.3.2.1 Cevada

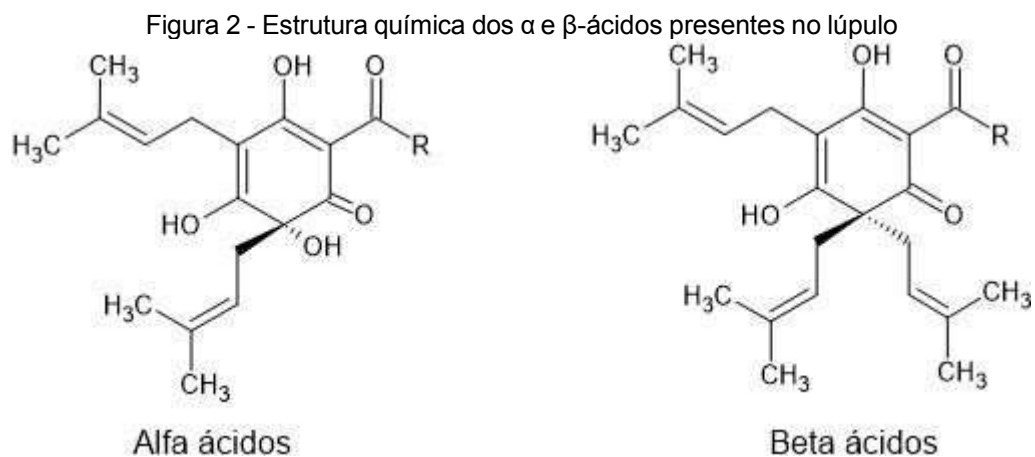
A cevada é uma gramínea cerealífera originária do Oriente, pertencente ao gênero *Hordeum*. Muito cultivada desde a antiguidade, atualmente inúmeras espécies são conhecidas, dentre elas, as chamadas "cevadas cervejeiras" são as mais utilizadas, otimizadas com o passar do tempo para a fabricação de cerveja. A grande maioria das espécies utilizadas possuem uma casca fixa ao grão, a qual funciona como agente filtrante na produção da bebida e protege o grão de impactos mecânicos sofridos durante o transporte e demais processos.

Os tipos de cevada utilizados na obtenção do malte para a fabricação de cerveja, podem ser divididos e diferenciados pelo número de fileiras de grãos, comumente duas ou seis fileiras de cada lado do ramo do cereal. Esses grãos devem apresentar algumas características adequadas, como: boa capacidade de germinação, alto rendimento de extração, baixa taxa de gordura e um conteúdo

específico de proteínas. Cerca de 6% da produção mundial de cevada se destina ao consumo humano, 21% para produção de cervejas e destilados e o restante é utilizado na alimentação animal (CRIBB, 2005; TRICASE *et al.*, 2018).

2.1.3.3 Lúpulo

O *Humulus lupulus* L. ou lúpulo, é uma planta dióica que produz flores masculinas e femininas e pertence à família *Cannabaceae*. A planta é nativa do hemisfério norte e é amplamente cultivada nas regiões de clima temperado ao redor do mundo. Conhecida como o "tempero" da cerveja, os α -ácidos (humulonas), β -ácidos (lupulonas) (Figura 2) e óleos essenciais presentes nas folhas fêmeas não fecundadas dessa planta conferem o sabor amargo e o aroma característicos da bebida, o conjunto dessas substâncias forma uma resina, conhecida como lupulina.



Fonte: Adaptada de Durello, Silva e Bogusz (2019).

As flores do lúpulo podem ser comercializadas secas, em pó, peletizadas (Figura 3) ou ainda na forma de extrato, sendo as duas últimas as mais encontradas e que proporcionam menor volume a ser transportado (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019; ROCHA, 2007).

Figura 3 - Lúpulo Tradition Hallertau em pellets



Fonte: Autoria própria (2020).

A composição média das flores secas de lúpulo, pode ser verificada na Tabela 2:

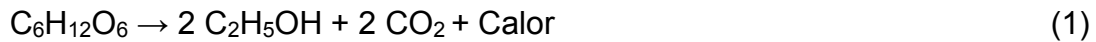
Tabela 2 - Perfil da composição das folhas secas de lúpulo

Constituinte	Quantidade (% m/m)
Resinas totais	15 - 30
Óleos essenciais	0,5 - 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	Traços - 25
Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

Fonte: Durello, Silva e Bogusz (2019).

2.1.3.4 Levedura

As leveduras são microrganismos eucariontes, predominantemente unicelulares e pertencentes ao reino dos fungos. Esses fungos são os responsáveis pela fermentação dos açúcares do mosto, convertendo-os basicamente em etanol e gás carbônico. Essa bioconversão é representada pela reação abaixo:



As leveduras mais utilizadas para a produção da cerveja são do gênero *Saccharomyces*: *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação e *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*) de baixa fermentação, sendo a *S. cerevisiae* a de maior capacidade fermentativa, capaz de fermentar sacarose, glicose, frutose galactose, manose, maltose e maltotriose. Esses microrganismos são os verdadeiros responsáveis pela fabricação da cerveja, são eles que transformam o mosto, nomeado também como "cerveja verde", na bebida fermentada como é conhecida. Cepas diferentes de leveduras são utilizadas para a fabricação de estilos de cervejas distintos e esses estilos podem ser agrupados em dois principais grupos: Ales e Lagers (HELLBORG; PIŠKUR, 2009; IATTICI; CATALLO; SOLIERI, 2020).

2.1.3.4.1 *Cervejas do tipo Ale e Lager*

As Ales são cervejas obtidas pela ação de leveduras de fermentação rápida (2 a 5 dias) e tumultuosa, com utilização de temperaturas mais altas no processo (15 a 25 °C), as quais se concentram na superfície do líquido. As Ales, intituladas como cervejas de alta fermentação, são antigas e surgiram antes do domínio da tecnologia da fermentação, em geral apresentam coloração escura, intenso sabor de lúpulo, levemente ácidas e com teor alcoólico entre 4 a 8%. Dentro desse grupo, podem ser mencionados os estilos: *Indian Pale Ale*, *Stouts* e *Porters*.

Ao contrário das Ales, as Lagers são cervejas resultantes de uma fermentação lenta (5 dias) e conduzida em baixas temperaturas (5 a 10 °C). São as cervejas do tipo Lager as mais consumidas no Brasil, tendo como principal exemplo a Pilsen, originária da cidade de Pilsen, República Tcheca (1842). São conhecidas por seu sabor suave, corpo baixo, cor clara e pouco teor alcoólico (4 a 5%). Os estilos mais

conhecidos dentro do grupo das Lagers são as *Pilsners*, *Muniques* e *Bocks* (MORADO, 2009).

2.1.4 A cerveja artesanal

A cerveja pode ser produzida em pequena quantidade e de maneira artesanal com utensílios caseiros adaptados, que se assemelham aos equipamentos utilizados em grandes cervejarias. O processo de fabricação da cerveja artesanal pode ser dividido essencialmente em dez etapas, sendo elas: Moagem, mosturação, recirculação, lavagem, fervura, resfriamento, fermentação, maturação, envase e carbonatação (Figura 4) (EßLINGER, 2009; PALMER, 2006).

Inicialmente os cereais maltados utilizados devem ser moídos, com o objetivo de expor o amido do endosperma do grão e soltar a casca que o reveste, essa casca atua na formação da camada de grãos que auxiliará a filtragem do mosto na etapa de lavagem. Com os grãos devidamente moídos, dá-se início a etapa de mostura, a qual tem duração aproximada de 90 minutos e tem como objetivo o cozimento dos grãos a temperaturas específicas, ótimas para a ação das enzimas α e β -amilases, presentes no malte, na "quebra" do amido em açúcares fermentáveis. A lavagem é a etapa seguinte e consiste em lavar os grãos com água quente o suficiente para inativar as enzimas do mosto e extrair o restante dos açúcares que possam ter sido retidos pela camada de grãos. Em seguida, todo o volume é fervido por cerca de 60 minutos e os lúpulos são adicionados, essa adição ocorre em intervalos específicos, trazendo o aroma e o sabor necessários para o estilo da cerveja a ser produzida. Após a fervura, todo o volume deve ser resfriado, o mais rápido possível, até a temperatura adequada para a inoculação das leveduras (EßLINGER, 2009; PALMER, 2006).

Por fim a fermentação se inicia, sendo importante o controle rígido da temperatura durante esse processo, evitando o estressamento do fermento, para que não ocorra a morte das leveduras ou formação de compostos secundários. Com o fim da fermentação, dá-se início a maturação, etapa onde a temperatura é reduzida, próximo a 0 °C, para que todo o material particulado presente na bebida decante ao fundo do fermentador, clarificando a cerveja. Para finalizar, a bebida deve ser gaseificada e artesanalmente existem dois métodos para que isso ocorra: Refermentação na garrafa e carbonatação forçada. O primeiro deles baseia-se na adição de uma solução contendo açúcares fermentescíveis dentro da garrafa, juntamente com a bebida, para que as leveduras presentes iniciem uma segunda

fermentação, esse processo leva cerca de 14 dias. Já o segundo método, consiste em injetar gás carbônico (CO₂) diretamente na bebida, em um recipiente que suporte a pressão exercida (EßLINGER, 2009; PALMER, 2006).

Figura 4 - Fluxograma básico do processo de fabricação da cerveja artesanal



Fonte: Adaptada de Payá et al. (2019)

2.1.5 *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral

A *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex. Reissek) Biral, é uma planta nativa e cultivada, principalmente, no sul do Brasil, pertencente à família *Celastraceae* e conhecida como "espinheira-santa", fazendo referência aos espinhos encontrados nas bordas das folhas (NIERO; DE ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011). Essa planta é popularmente utilizada como antiácido e para o tratamento de doenças gastrointestinais, como: dispepsias, gastrite e úlcera gastroduodenal. Ensaios farmacológicos revelaram também propriedades antiespasmódicas, contraceptivas, diuréticas, cicatrizantes e analgésicas, ligadas aos constituintes da planta. Em 2014 a *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex. Reissek) Biral foi oficialmente reconhecida como

fitoterápico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014; IANA BANTIM FELÍCIO CALOU; et al., 2014). Essas propriedades gastroprotetoras se dão principalmente pela presença de taninos (epigalocatequina) e os óleos essenciais (fridenelol) na planta (HOLNIK *et al.*, 2015). Além das moléculas já mencionadas, a composição química da planta conta com a presença de diversas outras espécies de compostos que apresentam atividade biológica, como: flavonóides, terpenóides, glicosídeos e alcalóides (LEITE *et al.*, 2001; MOSSI *et al.*, 2009; TIBERTI *et al.*, 2007). Ainda que apresente uma alta atividade biológica, a planta demonstra baixíssima toxicidade, o que torna segura a incorporação de seu extrato em bebidas e alimentos (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009).

Tabela 3 - Principais compostos químicos encontrados nas folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex. Reissek) Biral

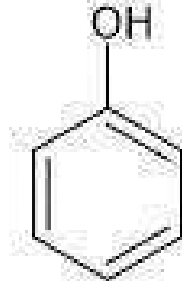
Classe	Substância Química	Referência
Glicosídeos	Illicifolinosídeo A, B e C	(ZHU; SHARAPIN; ZHANG, 1998)
Flavonoides heterosídicos	Canferol-3-gal-ram Canferol-3- gal-di(ram) Canferol-3-gal-di(ram)-glu Canferol-3-gal-di(ram)-ara Quercetina-3-gal-di(ram) Quercetina-3-gal-di(ram)-glu	(LEITE <i>et al.</i> , 2001)
Flavonoides heterosídicos	Canferol-3-hexose Canferol-3- ramno-hexose Canferol-3-di-(ramno)-hexose Canferol-3-pentose-ramnose Hiperosídeo(quercetina-3-Gal) Isoquercetrina(quercetina-3-Glu) Quercetina-3-ramno-hexose Quercetina-3-di-(ramno)-hexose Quercetrina(quercetina-3-ramnose) Rutina (quercetina-3-Glu-ram)	(TIBERTI <i>et al.</i> , 2007)
Taninos	Epicatequina-(4 β →8)-catequina (Procianidina B1) Epicatequina-(4 β →8)epicatequina (Procianidina B2)	(PESSUTO, 2006)
Triterpenos	Friedelan-3-ol e friedelina	(YARIWAKE <i>et al.</i> , 2005)

Fonte: Adaptada de Negri (2007).

2.1.6 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e outros, são espécies pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos. A estrutura básica desses compostos é formada por pelo menos um grupamento hidroxila, ligado diretamente a um anel aromático (Figura 5). Esses compostos estão presentes em grande quantidade no reino vegetal, sendo encontrados nas folhas, caule, seivas, raízes e até mesmo sementes de ervas e vegetais. São originárias do metabolismo secundário das plantas e responsáveis por funções como: pigmentação, crescimento, reprodução, defesa e proteção contra patógenos e luz ultravioleta. Mais de 8.000 estruturas fenólicas já foram identificadas e são continuamente estudadas, devido sua alta atividade antioxidante e biológica, sendo capazes de impedir a oxidação lipídica de alimentos e retardar o envelhecimento das células no organismo. Essa capacidade antioxidante dos compostos fenólicos vem da presença de radicais intermediários estáveis e a facilidade que suas estruturas exibem na doação de hidrogênio e elétrons (DAI; MUMPER, 2010; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Figura 5 - Estrutura básica dos compostos fenólicos



Fonte: Oliveira (2015).

A busca por antioxidantes naturais tem crescido muito nos últimos anos. Esse interesse, vem tanto da necessidade de prevenir a deterioração de alimentos, quanto reduzir o dano oxidativo em células vivas e substituir os antioxidantes sintéticos. Estudos apontam que o consumo de aditivos sintéticos está relacionado com atividade carcinogênica no organismo, diminuindo drasticamente a procura por alimentos acrescidos dessas espécies (GULTEKIN, 2015).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta e preparo do extrato das folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral

As folhas de *Monteverdia ilicifolia* foram coletadas no município de Verê (25°55'42.1"S 52°55'07.9"W), sudoeste paranaense, no mês de agosto de 2021. O extrato das folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex. Reissek) Biral foi obtido por extrações sequenciais, conforme descrito por Negri, Possamai e Nakashima (2009). As folhas coletadas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas em local livre de umidade até o uso. O material seco foi triturado em moinho de facas Wiley R-TE-650/1 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) e submetido ao processo de extração. Etanol absoluto, etanol 70% e água foram os solventes utilizados na extração sequencial, seguindo uma relação de 20 g de soluto para 100 mL de solvente. A extração ocorreu por maceração, em frascos Erlenmeyers de 250 mL, por um período de 24 horas em banho-maria BHS-6 (Akso, São Leopoldo, RS, Brasil) a 60 °C. Os extratos foram recuperados por filtração em papel filtro e combinados no final das etapas de extração para obtenção de um único extrato. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo RV 3 V (Ika, Campinas, SP, Brasil) a 40 °C e então liofilizado em liofilizador de bancada Liotop L102 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil) e mantido sob congelamento a -18 °C, até caracterização e uso.

2.2.2 Elaboração da cerveja artesanal

Um sistema de fogareiros tribloco (Indupropil, Ijuí, RS, Brasil) foi utilizado na etapa de brassagem durante a produção da cerveja. As rampas de temperatura de mosturação foram controladas com o auxílio de um termômetro (Incoterm, Porto Alegre, RS, Brasil) e a temperatura de fermentação foi controlada com auxílio de um termopar (Full Gauge MT-516, Canoas, RS, Brasil).

Na formulação da cerveja foram utilizados 4,2 kg de malte pilsen Agrária (Guarapuava, PR, Brasil), 0,1 kg de malte Blumenauer I (Blumenau, SC, Brasil), 50 g de Lúpulo Cascade em pellet T-90, safra 2021 com 6.2% α -ácidos e 7,7% β -ácidos (Yakima Chief Hops, Yakima, WA, Estados Unidos), 30 L de água potável e a levedura de alta fermentação *Saccharomyces cerevisiae* Safale US-04 (Fermentis, Marquette-lez-Lille, França).

Um volume total de 20 litros foi produzido e dividido em dois volumes iguais, o primeiro, denominado controle (sem adição do extrato) e o segundo, denominado cerveja + EV (300 mg de extrato por litro de cerveja).

2.2.3 Mosturação, fervura e resfriamento

Três tinas de alumínio com volume de 56 L foram utilizadas nas etapas de mosturação e fervura. Na tina de mosturação um volume de 20 L de água foi aquecido a 72 °C e então o malte moído foi adicionado. A temperatura do sistema foi mantida a 64,4 °C por 60 minutos, com recirculação do mosto durante o processo. Para confirmação da total conversão do amido do malte em açúcares fermentescíveis, uma alíquota do mosto foi retirada e submetida ao “teste de iodo”. Na sequência a temperatura do sistema foi elevada para 75,6 °C e mantida por 10 minutos, para inativação enzimática.

O mosto foi transferido para a tina de fervura sendo filtrado através do leito filtrante constituído pelas cascas e grãos depositados no topo do fundo falso. Simultaneamente a transferência do mosto, um volume de 10 L de água a 75,6 °C foi empregado na lavagem do leito filtrante, para maximizar a extração dos açúcares.

O mosto obtido foi submetido à fervura por 60 minutos, com adição de 15 g de lúpulo no minuto inicial da etapa e 35 g no final. Após fervura foi realizado processo de *whirlpool*, para remoção de colóides, material proteico e demais subprodutos (*trub*), buscando a obtenção de um mosto mais límpido. O mosto (OG 1.044 g cm⁻³) foi resfriado com uso de sistema de resfriamento (*chiller* de imersão) a aproximadamente 20 °C e transferido para a bombona de fermentação com airlock. A bombona de fermentação foi previamente sanitizada com solução iodofor (mistura de iodo, detergentes, agentes umectantes e solubilizantes).

2.2.4 Inoculação, fermentação e maturação

O mosto com densidade inicial de 1.052 g/cm³ (OG), foi inoculado com 11,5 g de levedura liofilizada *S. cerevisiae* (Safale US-04) e mantido a 20 °C por sete dias quando a densidade do mosto (FG: final gravity) atingiu o valor de 1.012 g/cm³. O fermentado foi dividido em duas bombonas de fermentação em volumes iguais (10 L). Um volume de 200 mL do extrato aquoso (15 g/L) das folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral foi adicionado a um dos volumes, de forma a ser obtida uma

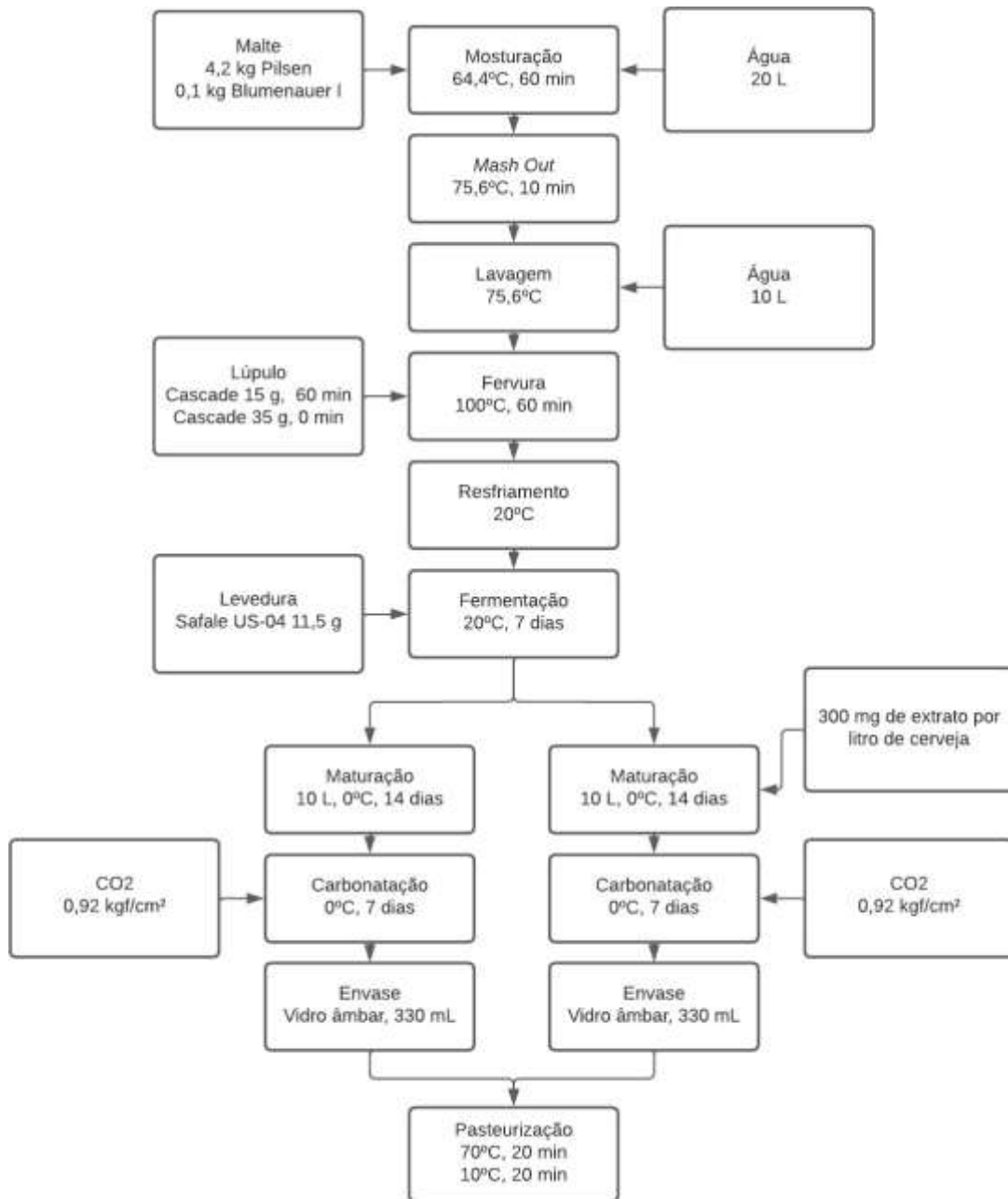
bebida com concentração de 300 mg de extrato por litro. As amostras de cerveja foram mantidas a 0 °C em geladeira com controle de temperatura por quatorze dias para a maturação.

2.2.5 Carbonatação, envase e pasteurização

Ao fim da maturação, as cervejas produzidas foram transferidas para um barril PET âmbar com capacidade de 30 L e submetidas à carbonatação forçada por sete dias a 0°C. O sistema de carbonatação consistiu de um cilindro de alumínio de 4 kg acoplado a uma válvula reguladora HBS0301-01 (Home Brew Supplies, Itajaí, SC, Brasil) de pressão (0,92 kgf/cm² - 13 psi) e gás carbônico sendo utilizado como agente de gaseificação. Os valores de referência para a pressão empregada na carbonatação foram baseados em valores comumente utilizados por cervejeiros artesanais (Anexo A).

Após carbonatação as cervejas foram envasadas em garrafas de vidro âmbar com volume de 300 mL. O envase foi feito sob pressão utilizando um sistema de extração constituído por um cilindro de CO₂ acoplado a uma válvula extratora HBS0301-01 (Home Brew Supplies, Itajaí, SC, Brasil) e mangueiras de conexão. As garrafas com a bebida foram pasteurizadas por imersão em água a 62 °C por 20 minutos. Após a pasteurização as garrafas foram resfriadas por imersão em água a 10 °C durante 20 minutos e então armazenadas a 4 °C em geladeira.

Figura 6 - Fluxograma do processo de fabricação da cerveja elaborada no presente trabalho



Fonte: Autoria própria (2022).

2.3 Caracterização físico-química das cervejas

As amostras foram caracterizadas quanto aos parâmetros de qualidade, cor (EBC), teor alcoólico (ABV), unidades de amargor (IBU), pH final, estabilidade da espuma, extrato primitivo, extrato real, extrato aparente e também fenólicos totais, polifenóis totais, determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência e potencial antioxidante (captura dos radicais ABTS•+ e

DPPH• e poder redutor do íon férrico, FRAP). As análises foram realizadas em até 24 horas após amostragem e com a bebida descarbonatada em cuba ultrassônica 2,1 L (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil).

2.3.1 Análise de cor (unidades EBC)

A coloração da cerveja foi determinada utilizando o método 9.6 da European Brewery Convention (2005). As amostras descarbonatadas foram previamente filtradas em filtro de membrana PTFE com porosidade de 0,45 µm e as leituras de absorvância realizadas em espectrofotômetro de absorção molecular Uv-Vis (430 nm) Lambda 45 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando cubetas de vidro de 10 mm. Água foi utilizada para zerar a leitura do aparelho a 430 nm. O resultado foi obtido através da Equação 2.

$$Cor (EBC) = A * 25 \quad (2)$$

Sendo, A a absorvância da solução a 430 nm.

2.3.2 Determinação do teor alcoólico em volume (ABV)

Os teores alcoólicos das amostras de cervejas foram determinados por destilação seguindo o método 9.2.1 da European Brewery Convention (2005) e os resultados expressos em ABV (alcohol by volume) v/v. Uma amostra de 100 g de cerveja foi pesada em béquer de 250 mL e transferida para balão de destilação de 500 mL, juntamente com 50 mL de água destilada (lavagem do béquer). O balão de destilação foi acoplado a um sistema de destilação por arraste de vapor. Aproximadamente 90 mL de condensado foi coletado e este volume foi ajustado para 100 mL em balão volumétrico, com água destilada. A densidade do destilado (SGa) foi determinada a 20 °C com auxílio de picnômetro e o teor alcoólico calculado pelas equações 3 (% m/m) e 4 (% v/v).

$$TA \left(\%, \frac{m}{m} \right) = [517,4 * (1 - SGa)] + [5084 * (1 - SGa)^2] + [33503 * (1 - SGa)^3] \quad (3)$$

$$TA \left(\%, \frac{v}{v} \right) = A\% \left(\frac{m}{m} \right) * \frac{SG_{ea}}{SG_{etanol \ a \ 20^{\circ}C}} \quad (4)$$

Sendo, TA o teor alcoólico e SGa a densidade específica do destilado e SG Etanol a densidade específica do Etanol (0,791 g/cm³).

2.3.3 Unidades de amargor (IBU)

Para determinação das unidades de amargor da bebida o método 9.8 da European Brewery Convention (2005) com sutil adaptação foi utilizado. Um volume de 20 mL de amostra foi acidificado com 1 mL de solução de HCl (6 mol/L) em frasco Erlenmeyer de 250 mL e misturado com 40 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) P.A, para a extração das substâncias amargas da bebida. O frasco foi submetido a agitação (100 rpm) a 25 °C até estabilização (60 minutos) da leitura espectrofotométrica (275 nm) em espectrofotômetro de absorção molecular Uv-Vis Lambda 45 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). Para verificação da estabilização da leitura, as amostragens foram conduzidas a cada 20 minutos, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm. Iso-octano P.A foi utilizado para zerar a leitura do equipamento a 275 nm. Os resultados foram expressos em unidades de amargor (BU, bitterness unit) segundo a Equação 5.

$$BU = A * 50 \quad (5)$$

Sendo, A a absorbância da solução a 275 nm.

2.3.4 pH final

A determinação do pH final foi realizada pelo método potenciométrico 9.35 da European Brewery Convention (2005), com medição direta das amostras utilizando pHmetro digital de bancada PHB-550 (IncoTerm, Porto Alegre, RS, Brasil).

2.3.5 Estabilidade de espuma

A determinação da estabilidade de espuma foi realizada utilizando o “*shake method*” descrito por Kapp e Bamforth (2002). Um volume de 5 mL das amostras foram adicionados a tubos de ensaio de 15 mL e tampados firmemente, os tubos foram então agitados em um arco de 40 cm com 10 oscilações por 10 s. Com o frasco ainda tampado, a altura inicial da espuma (distância do topo da espuma até a interface espuma/líquido) foi medida com paquímetro de aço (Lotus, Serra, ES, Brasil), em

seguida a tampa foi retirada e após 30 minutos uma nova leitura da altura da espuma foi realizada. O resultado é expresso em alteração percentual da altura da espuma.

2.3.6 Extratos primitivo, real e aparente

O extrato aparente considera a presença do Etanol na amostra e sua determinação baseia-se na conversão do valor da densidade relativa da amostra em % de extrato aparente. Um volume de 100 mL de amostra foi filtrado em papel filtro e sua densidade determinada (20 °C) por meio de picnômetro, com volume previamente aferido com água destilada (20 °C). A densidade relativa encontrada foi convertida em extrato aparente com auxílio do quadro da conversão da densidade relativa a 20°C/20 °C em porcentagem de extrato (Anexo B) e expressa em °Plato (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

O extrato real corresponde a todos os sólidos da composição da cerveja. Em sua determinação, a densidade relativa do resíduo da destilação alcoólica é considerada. O resíduo da destilação foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume ajustado com água destilada até a massa inicial (100 g). A densidade foi medida utilizando um picnômetro de 25 mL. O valor de densidade relativa do resíduo foi convertido em extrato real pela correlação descrita no quadro da conversão da densidade relativa a 20°C/20 °C em porcentagem de extrato (Anexo B) e expresso em °Plato (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

O extrato primitivo ou original é o extrato inicialmente presente no mosto não fermentado. No seu cálculo os valores de teor alcoólico e extrato real previamente obtidos são considerados. A fórmula de Balling (Equação 6) relaciona a porcentagem de álcool em massa (P) com a porcentagem de extrato real (Er) expressando o valor do extrato primitivo (EP) em °Plato. O resultado deve ser considerado até a primeira casa decimal (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

$$EP \text{ (}^\circ\text{Plato)} = \frac{[(P*2,0665)+ Er]* 100}{[100 + (P*1,0665)]} \quad (6)$$

A equação 6 baseia-se no balanço de massa teórico da fermentação alcoólica, onde 1 g de açúcar assimilado (considerando o crescimento celular das leveduras) rende 0,4839 g de etanol e 0,4628 g de dióxido de carbono. Expressando em termos do álcool, 2,0665 g de açúcar devem render 1 g de etanol, 0,9565 g de CO₂ e 0,11 g

de levedura. Assim o valor de 1,0665 g corresponde à soma dos conteúdos teóricos de CO₂ (0,9565 g) e massa de levedura (0,11 g), os quais não são convertidos em etanol (ŠAVEL *et al.*, 2020; ŠAVEL; KOŠIN; BROŽ, 2015).

2.3.7 Fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais presentes na bebida foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio foram misturados 0,5 mL das amostras devidamente diluídas (1:5) com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (100 mL/L) e deixado em repouso na ausência de luz por aproximadamente 5 minutos. Na sequência, foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio (40 g/L), seguido de novo repouso de 2 horas ao abrigo da luz. Leituras de absorção foram tomadas a 740 nm usando cubetas de quartzo de 10 mm. O branco foi constituído de 0,5 mL de água destilada, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído e 2 mL da solução de carbonato de sódio (40 g/L). Os resultados foram obtidos por correlação com curva padrão de ácido Gálico (2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L; 35 mg/L; 55 mg/L; 70 mg/L e 90 mg/L) e expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por litro de cerveja (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

2.3.8 Polifenólicos totais

Para a análise de polifenólicos totais, uma solução contendo 10 g de Carboximetilcelulose de sódio (CMC) e 2 g de EDTA dissódico di-hidratado em água ultrapura, foi preparada. Em um balão volumétrico de 25 mL foram misturados um volume de 10 mL de amostra com 8 mL do reagente CMC/EDTA. Na sequência foram acrescentados 0,5 mL de uma solução de citrato de Ferro III (16% Fe) e amônio verde (0,35 g/L) e 0,5 mL de uma solução diluída de hidróxido de amônia (100 mL de hidróxido de amônia PA em 300 mL de água ultrapura) e o volume completado. A absorbância da mistura foi medida após 10 min em espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta-visível em comprimento de onda fixo de 600 nm. Para zerar o equipamento foi utilizada a mesma solução sem a adição do reagente férrico. Os resultados foram expressos em mg de polifenóis por L de cerveja, utilizando a seguinte fórmula:

$$P = A * 820 * F \quad (7)$$

Onde, P é o teor de polifenóis por litro de cerveja, A é a absorvância a 600 nm e F o fator de diluição das amostras (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005).

2.3.9 Determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise foi realizada utilizando um sistema LC-920 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, Estados Unidos) juntamente com uma coluna C18 RP (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Eclipse Plus (Agilent Technologies, Wilmington, DE, Estados Unidos), com temperatura de forno ajustada para 30 °C. Como fase móvel foi empregado um gradiente consistindo de água ultrapura (A) e ácido acético:acetonitrila:água (2:40:58 v/v) (B), com vazão de 1 mL/min. A corrida teve início com 5% de B, subindo para 20% em 2 minutos, 25% de B aos 15 min, 85% de B aos 25 min, sendo mantida essa proporção por 5 min, aos 30 min a fase B foi elevada a 95% para limpeza da coluna e dos 36 aos 45 min reduzida para 5%, para ambientação de todo o sistema do equipamento. As leituras foram realizadas em uma faixa bem definida de 200 a 400 nm e os compostos foram identificados por meio da comparação do tempo de retenção e perfil de absorção dos padrões previamente injetados no equipamento. Para quantificação dos compostos identificados, uma curva de calibração foi construída com soluções dos padrões ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina, ácido cumárico, ácido ferúlico, rutina, isoquercetina, astragalina, miricetina, ácido salicílico, quercetina, ácido cinâmico e canferol nas concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20 e 50 mg/L. Para análise, um volume de 10 µL de amostra previamente descarbonatada e filtrada em filtros PTFE (0,45 µm) foi injetada (SAVI *et al.*, 2020).

2.3.10 Determinação da atividade antioxidante

2.3.10.1 Sequestro do radical do ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6 ácido sulfônico)

O ensaio foi conduzido seguindo o método descrito por Re *et al.* (1999). O radical ABTS•+ foi obtido pela reação de uma solução de 5 mL ABTS (7 mmol/L) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (140 mmol/L) em um tubo de ensaio mantido a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas. Na sequência a solução do radical (ABTS•+) foi diluída com etanol absoluto até a

obtenção de absorvância de 0,700, medida em comprimento de onda fixo de 734 nm. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo de 10 mm. Um volume de 30 µL de cada amostra, adequadamente diluída, foi misturado com 3 mL da solução de radical ABTS•+ e homogeneizadas. Após 6 minutos de reação a absorvância foi medida em espectrofotômetro de absorção molecular Uv-Vis Lambda 45 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) a 734 nm, utilizando etanol absoluto como branco. Curva padrão foi construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico) como antioxidante de referência (0,1 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L e 2 mmol/L). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox equivalente por litro de cerveja.

2.3.10.2 Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A mistura reacional foi preparada em tubos de ensaio contendo um volume de 0,5 mL de amostra adequadamente diluída, 3 mL de etanol (80% v/v) e 0,3 mL de uma solução do DPPH• (0,5 mmol/L) em etanol. A mistura foi armazenada por 45 minutos no escuro à temperatura ambiente para então ser alocada em cubetas de quartzo de 10 mm. As leituras de absorvância foram tomadas a um comprimento de onda fixo de 517 nm. O branco foi obtido pela mistura de 0,5 mL de amostra e 3,3 mL de etanol (80% v/v). A curva padrão foi construída com Trolox (15 µmol/L; 25 µmol/L; 50 µmol/L; 75 µmol/L e 100 µmol/L). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox equivalente por litro de cerveja (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

2.3.10.3 Poder antioxidante redutor do íon férrico (FRAP)

A análise do poder antioxidante de redução do íon ferro III foi realizada baseada no método de Benzie e Strain (1996). Inicialmente foi preparado o reagente FRAP pela mistura de um volume de 25 mL de solução tampão acetato de sódio (300 mmol/L, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mmol/L) em HCl (40 mmol/L), 2,5 mL de solução de Cloreto Férrico (20 mmol/L). A mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A mistura reacional foi constituída de 90 µL da amostra, devidamente diluída, 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram agitados em vortex e incubados ao abrigo da luz por 30 minutos a 37 °C e então a absorvância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. O reagente FRAP foi utilizado como branco. A curva padrão de Sulfato Ferroso (FeSO₄) (0,2

mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L e 2 mmol/L) foi preparada a partir de solução padrão de FeSO₄ 4 mmol/L. O poder redutor do íon férrico foi expresso como µmol de Sulfato Ferroso equivalente por litro de cerveja.

2.3.11 Análise estatística

Os dados apresentados são médias ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9.3.0. O teste t de Student foi aplicado para as análises a um nível de significância de $p < 0,05$. Os dados que apresentam diferenças significativas entre si são expressos acompanhados de letras diferentes.

2.4 Resultados e discussões

De acordo com os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela instrução normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2019), as cervejas produzidas neste estudo podem ser classificadas como cervejas puro malte, com graduação alcoólica acima de 2% (v/v), com extrato primitivo superior a 5% em peso.

O estilo das cervejas produzidas foi classificado de acordo com o guia de estilos do Beer Judge Certification Program (BJCP, 2021). Como pode ser observado na Tabela 4, as cervejas foram enquadradas como American Blonde Ales.

Tabela 4 - Parâmetros vitais das cervejas American Blonde Ale e das cervejas produzidas

Parâmetros vitais da cerveja	Blonde Ale	Controle	Cerveja + EV*
OG (g/cm ³)	1.038 - 1.054		1.054
FG (g/cm ³)	1.008 - 1.013		1.012
Teor alcoólico (ABV)	3.8 - 5.5	5,21 ± 0,30 ^a	5,18 ± 0,37 ^b
Unidades de amargor (IBU)	15 - 28	24,05 ± 1,45 ^a	20,85 ± 0,90 ^b
Cor (EBC)	5.91 - 11.82	10,33 ± 0,09 ^a	9,60 ± 0,08 ^b

OG: *Original Gravity*, FG: *Final Gravity*, EV* Extrato Vegetal

Fonte: BJCP (2021).

Observa-se que todos os parâmetros vitais encontrados para cervejas produzidas se enquadram dentro do que é esperado de uma American Blonde Ale.

Os ingredientes utilizados para a fabricação também corroboram com a classificação do estilo, visto que American Blonde Ales geralmente são puro malte, podem levar qualquer varietal de lúpulo em sua composição e leveduras inglesas levemente frutadas, que é o caso da Safale US-04. As matérias primas utilizadas estão na lista de ingredientes característicos do Beer Judge Certification Program (2021).

A adição do extrato a cerveja contribuiu para uma pequena redução nos valores dos parâmetros amargor e cor. Tal comportamento pode estar associado a uma possível capacidade aglutinante do extrato durante a etapa de maturação. Uma possível atividade aglutinante do extrato poderia contribuir para a aglutinação de partículas coloidais e conseqüente decantação e pequena clarificação da cerveja acrescida do extrato. Tal decantação seria responsável por concentrar um maior número de partículas no fundo da bombona de fermentação e com isso retirar parte das substâncias amargas da cerveja. Da mesma forma, o processo de decantação possivelmente foi responsável por certa clarificação da cerveja, o que levou a obtenção de menores valores do parâmetro cor na cerveja enriquecida com extrato (9,60 IBU) também afetou a cor observada, sendo que a cerveja + EV apresentou menor valor quando comparada ao grupo controle.

O principal objetivo da adição do extrato de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral na formulação (300 mg/L_{cerveja}), foi enriquecer o produto em compostos fenólicos bioativos e potencializar a capacidade antioxidante da bebida. De fato, o extrato vegetal demonstrou ser rico em compostos fenólicos (912,67 ± 18,31 mg GAE/g ext. liofilizado). Neste contexto, os flavonóides catequina (7,98 mg/g_{ext. liofilizado}) e epicatequina (34,4 mg/g_{ext. liofilizado}) pertencentes a classe flavan-3-ol, revelaram-se os compostos fenólicos majoritários entre os identificados (Tabela 5). Tal comportamento já era esperado visto que estes compostos se apresentam como marcadores químicos da planta (LEITE *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2018). O flavonóide rutina (1,72 mg/g_{ext. liofilizado}) e os ácidos fenólicos: gálico (0,13 mg/g_{ext. liofilizado}), clorogênico (0,64 mg/g_{ext. liofilizado}) e cafeico (0,218 mg/g_{ext. liofilizado}) também foram identificados e quantificados no extrato.

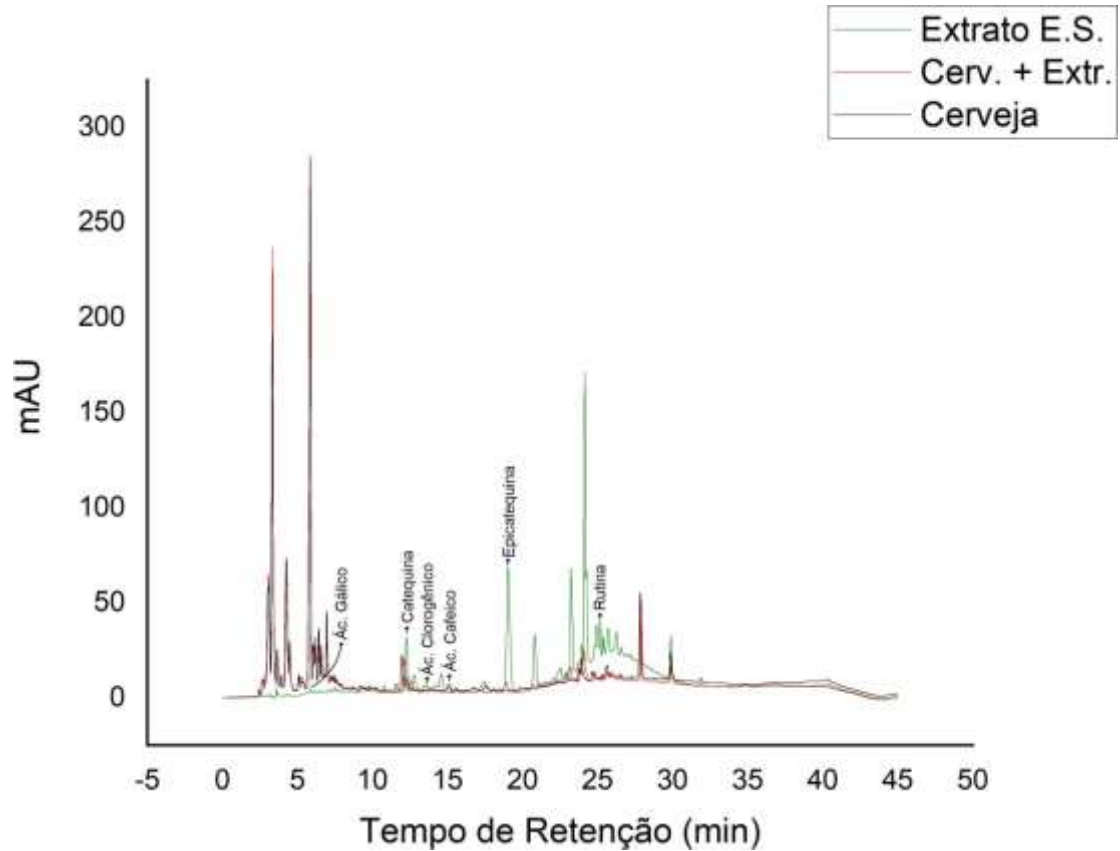
Tabela 5 - Compostos bioativos presentes no extrato liofilizado das folhas de *M. ilicifolia*, na cerveja controle e na cerveja + EV*

Compostos identificados	EV*	Controle	Cerveja + EV*
Ácido gálico	0,13 ± 0,02 (mg/g _{ext. liofilizado})	nd	nd
Catequina	7,98 ± 0,10 (mg/g _{ext. liofilizado})	24,88 ± 0,10 (mg/L)	25,63 ± 0,08 (mg/L)
Ácido clorogênico	0,64 ± 0,04 (mg/g _{ext. liofilizado})	nd	nd
Ácido cafeico	0,22 ± 0,04 (mg/g _{ext. liofilizado})	nd	0,88 ± 0,04 (mg/L)
Epicatequina	34,36 ± 0,04 (mg/g _{ext. liofilizado})	nd	15,09 ± 0,08 (mg/L)
Rutina	1,72 ± 0,02 (mg/g _{ext. liofilizado})	nd	nd

EV* Extrato Vegetal, mg/g_{ext. liofilizado}: Miligrama do composto por grama do extrato liofilizado

Catequina (2,0 mg/g_{folhas}) e epicatequina (4,4 mg/g_{folhas}) também foram encontrados por Duarte, Antunes e Sawaya (2022) em extrato preparado com 20 mg de folhas secas de *M. ilicifolia* em 10 mL de água ultrapura, com extração em banho ultrassônico a temperatura ambiente por 30 min. O demais compostos fenólicos encontrados no presente estudo não foram reportados por estes autores. Na Figura 7 pode-se observar a sobreposição do perfil cromatográfico das amostras do extrato vegetal, da cerveja adicionada do extrato vegetal e da cerveja controle.

Figura 7 - Perfil cromatográfico das amostras



Por meio da Tabela 6, pode-se observar que a adição do extrato elevou os teores de fenólicos totais e polifenóis totais da bebida, sendo o grupo dos polifenóis totais o de mais expressivo aumento.

Tabela 6 - Quantidade de fenólicos e polifenóis totais encontrados para as cervejas elaboradas

Parâmetros analisados	Cerveja Controle	Cerveja + EV*
Fenólicos totais (mg GAE/L)	342,38 ± 2,46 ^a	365,99 ± 5,02 ^b
Polifenóis totais (mg/L)	147,60 ± 1,60 ^a	248,73 ± 1,91 ^b

EV* Extrato Vegetal

Um menor conteúdo de fenólicos totais (326 mg GAE/g) foi reportado por Alves et al. (2022) em extrato de folhas de outra espécie de espinheira santa, a *Monteverdia aquifolia*, obtido por extração com líquido pressurizado (etanol 40 °C). Importante destacar que espécies diferentes de plantas do mesmo gênero podem apresentar conteúdos diferentes de biocomposto. Outros aspectos também envolvidos

diretamente no conteúdo de compostos bioativos são alguns fatores abióticos como a época e horário da coleta da planta, condições nutricionais, temperaturas durante cultivo, humidade, etc (OLDONI *et al.*, 2022). Plantas medicinais cujo o cultivo ocorre em condições de exposição a estresses abióticos, geralmente exibem concentrações significativamente mais altas de metabólitos secundários (especializados) do que plantas idênticas da mesma espécie cultivadas em condições favoráveis (TERLETSKAYA *et al.*, 2021).

Aumentos significativos nos teores de fenólicos totais em cervejas incorporadas com extratos de plantas e frutas também foram reportados previamente (NARDINI; FODDAI, 2020a; NARDINI; GARAGUSO, 2020). Isso demonstra que a adição de extratos de plantas de fato é capaz de enriquecer a bebida com substâncias bioativas, o que pode trazer benefícios ao organismo do consumidor.

Em relação as análises de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP realizadas com o grupo controle comparado a cerveja com adição do extrato, observou-se um aumento significativo na atividade antioxidante da bebida. Indicando que os antioxidantes naturais presentes nas folhas da planta migraram para a cerveja, incorporando suas propriedades na cerveja. O teste de DPPH não demonstrou diferenças significativas entre as amostras controle e enriquecida com extrato a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7 - Atividade antioxidante das cervejas elaboradas

Parâmetros analisados	Controle	Cerveja + EV*
ABTS ($\mu\text{mol TEAC/L}$)	1541,68 \pm 95,37a	2158,35 \pm 50,46b
DPPH ($\mu\text{mol TEAC/L}$)	0,367 \pm 0,07a	0,421 \pm 0,05a
FRAP ($\mu\text{mol eq. FeSO}_4\text{/L}$)	3320,36 \pm 97,37a	4660,40 \pm 99,60b

EV* Extrato Vegetal

A adição do extrato vegetal potencializou a atividade antioxidante da bebida em 40% e 40,36% em relação a capacidade de captura dos radicais ABTS e poder redutor do íon férrico. Uma melhora na capacidade antioxidante da cerveja adicionada de extratos de plantas, frutas e outros tipos adjuntos também foi observado por outros

autores (MARTIN-LOBERA *et al.*, 2022; NARDINI; FODDAI, 2020b; NUNES FILHO *et al.*, 2021; SORBO; BROETTO, 2019).

Na Tabela 8 estão descritos os parâmetros físico-químicos de qualidade das cervejas produzidas.

Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos das cervejas elaboradas

Parâmetros Físico-químicos	Cerveja Controle	Cerveja + EV*
pH	4,57 ± 0,01 ^a	4,43 ± 0,01 ^b
Estabilidade da espuma (%)	78,99 ± 3,85 ^a	81,48 ± 12,57 ^b
Extrato real (°Plato)	5,02 ± 0,40 ^a	4,82 ± 0,50 ^a
Extrato aparente (°Plato)	2,32 ± 0,08 ^a	2,40 ± 0,10 ^a
Extrato original (°Plato)	12,21 ± 0,06 ^a	13,43 ± 0,70 ^b
Teor de matéria inorgânica (%)	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a

EV* Extrato Vegetal

Conforme pode ser observado, houve uma leve redução no valor do pH da cerveja adicionada de extrato de espinheira-santa em relação a cerveja controle. Este comportamento poderia estar associado a presença de ácidos fenólicos oriundos do extrato vegetal.

Em relação a espuma, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ao nível de 95% de confiança, sendo a cerveja com adição do extrato aquela com maior alteração no percentual de espuma. Esta diferença foi observada devido a menor quantidade de sólidos em suspensão decantados devido a adição do extrato, no conteúdo destes sólidos estão presentes proteínas, derivadas principalmente do lúpulo, as quais são fundamentais para a formação de uma espuma mais estável e persistente (HU; JIN; DU, 2019; NIU *et al.*, 2018). O extrato real e o extrato aparente também não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Por outro lado, os valores do extrato original diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre as amostras controle e acrescida de extrato. Este fenômeno pode estar associado a adição do extrato vegetal na bebida (cerveja + EV)

ou ainda a algum possível desvio experimental, o qual promoveu a diferença observada no resultado obtido.

Como era esperado, as cervejas não diferiram em relação ao conteúdo de matéria inorgânica ($p < 0,05$), o que demonstra que a adição do extrato vegetal nas concentrações utilizadas não contribuiu para o enriquecimento mineral da cerveja ou tais minerais foram consumidos pela levedura durante maturação.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do extrato de *Monteverdia ilicifolia* na produção de cerveja artesanal estilo Blonde Ale para o enriquecimento do produto em compostos bioativos mostrou ser viável. A adição de apenas 300 mg de extrato liofilizado por litro de bebida contribuiu para o enriquecimento do produto em compostos fenólicos e polifenólicos. Catequina e epicatequina foram os biocompostos presentes em maior concentração da bebida acrescida do extrato. A cerveja enriquecida com o extrato de *M. ilicifolia* apresentou maior atividade antioxidante, especialmente em relação a capacidade de captura do radical ABTS e poder redutor do íon férrico. A utilização do extrato de *M. ilicifolia* na produção de cervejas especiais representa uma inovação no mercado e pode despertar o interesse dos consumidores do mercado de cervejas especiais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Tales Prado *et al.* Improved extraction of bioactive compounds from *Monteverdia aquifolia* leaves by pressurized-liquid and ultrasound-assisted extraction: Yield and chemical composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 181, p. 105468, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844621003107>.
- ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos**. Brasília: [s. n.], 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-capa2.pdf>.
- AQUARONE, Eugênio; LIMA, Urgel de Almeida; BORZANI, Walter. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. [S. l.: s. n.], 1983.
- ASCENSIÓN, Marcos *et al.* Moderate Consumption of Beer and Its Effects on Cardiovascular and Metabolic Health: An Updated Review of Recent Scientific Evidence. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 24, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/3/879>.
- BEHRE, Karl-Ernst. The history of beer additives in Europe — A review. **Vegetation History and Archaeobotany**, [s. l.], v. 8, n. 1–2, p. 35–48, 1999. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02042841>.
- BENZIE, Iris F.F.; STRAIN, J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>.
- BIAZUS, Joana Paula Menezes *et al.* Production and characterization of amylases from *Zea mays* malt. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 991–1000, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132009000400024&lng=en&tlng=en.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>.
- BRASIL, Mapa. Anuário da cerveja: 2021. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, [s. l.], p. 24, 2021. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2021/04/anuariocerveja2.pdf.
- BRAZIL. ANVISA, (National Health Surveillance Agency). Normative Instruction No. 2, of May 13, 2014. List of phytotherapeutic drugs of simplified registration. Ministry of Health. Brazil. [s. l.], 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf.
- CABRAS, Ignazio; HIGGINS, David M. Beer, brewing, and business history. **Business History**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 609–624, 2016. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00076791.2015.1122713>.
- CARVALHO, Daniel; CURTO, Andreia; GUIDO, Luís. Determination of Phenolic Content in Different Barley Varieties and Corresponding Malts by Liquid Chromatography-diode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Antioxidants**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 563–576, 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-3921/4/3/563>.

- CERVBRASIL. **DADOS DO SETOR CERVEJEIRO NACIONAL**. [S. l.], 2016. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/. Acesso em: 19 jun. 2022.
- CERVIERI JÚNIOR, Osmar *et al.* O Setor de Bebidas no Brasil. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social**, [s. l.], v. 40, p. 93–129, 2014. Disponível em: http://www.mzweb.com.br/cremer/web/conteudo_pt.asp?idioma=0&tipo=15684&conta=28.
- CHEIRAN, Kamila P. *et al.* Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. **Food chemistry**, [s. l.], v. 286, n. June 2018, p. 113–122, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.198>.
- CRIBB, S. J. GEOLOGY OF BEER. **Encyclopedia of Geology**, [s. l.], p. 78–81, 2005. Disponível em: Acesso em: 12 nov. 2022.
- DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313>.
- DE VARGAS GIORGI, Victor. “Cultos em cerveja”: discursos sobre a cerveja artesanal no Brasil. **Sociedade e Cultura**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2016. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/fchf/article/view/40607>.
- DUARTE, Rodolfo Santos; ANTUNES, Elisa Ribeiro Miranda; SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland. Simultaneous UHPLC-MS Quantification of Catechins and Untargeted Metabolomic Profiling for Proof-of-Concept Authenticity Determination of *Maytenus* ssp. Samples. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 5520, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/17/5520>.
- DURELLO, Renato; SILVA, Lucas; BOGUSZ JR., Stanislaw. QUÍMICA DO LÚPULO. **Química Nova**, [s. l.], 2019. Disponível em: http://quimicanova.s bq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6968&nomeArquivo=RV20190148.pdf.
- EBLINGER, Hans Michael. **Handbook of Brewing**. [S. l.]: Wiley, 2009. *E-book*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527623488>.
- EBLINGER, Hans Michael; NARZISS, Ludwig. Beer. *Em*: ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a03_421.pub2.
- EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**. [S. l.: s. n.], 2005.
- GULTEKIN, Fatih. Food Additives of Public Concern for their Carcinogenicity. **Journal of Nutritional Health & Food Science**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 01–06, 2015. Disponível em: <http://www.symbiosisonlinepublishing.com/nutritionalhealth-foodscience/nutritionalhealth-foodscience49.php>.
- HELLBORG, Linda; PIŠKUR, Jure. Yeast Diversity in the Brewing Industry. *Em*: BEER IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION. [S. l.]: Elsevier, 2009. p. 77–88. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123738912000079>.
- HOLNIK, P.R. *et al.* Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional - Foz do Iguaçu, PR - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 385–391, 2015.
- HU, Xiunan; JIN, Yuhong; DU, Jinhua. Differences in protein content and foaming properties of cloudy beers based on wheat malt content. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 235–241, 2019.

IANA BANTIM FELÍCIO CALOU; *et al.* A ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA On line**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 33–42, 2014.

IATTICI, Fabrizio; CATALLO, Martina; SOLIERI, Lisa. Designing new yeasts for craft brewing: When natural biodiversity meets biotechnology. **Beverages**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–20, 2020.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 1^oed. São Paulo: [s. n.], 2008. v. 4

KAPP, Gregory R; BAMFORTH, Charles W. The foaming properties of proteins isolated from barley. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 82, n. 11, p. 1276–1281, 2002.

LEITE, João Paulo v. *et al.* Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 248–254, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532010000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

LEITE, J P *et al.* Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 3796–3801, 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf010294n>.

MÄKINEN, Outi E.; ARENDT, Elke K. Nonbrewing Applications of Malted Cereals, Pseudocereals, and Legumes: A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 223–227, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-2015-0515-01>.

MAPA. Diário oficial da união. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da União**: Brasil, 239, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>.

MARTIN-LOBERA, Carlos *et al.* Bread as a Valuable Raw Material in Craft Ale Beer Brewing. **Foods**, [s. l.], p. 13, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/363927783_Bread_as_a_Valuable_Raw_Material_in_Craft_Ale_Beer_Brewing.

MORADO, Ronaldo. **LAROUSSE DA CERVEJA**. [S. l.: s. n.], 2009. *E-book*. Disponível em: www.alaude.com.br.

MOSSI, AJ. *et al.* Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 339–345, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842009000200015&lng=en&tlng=en.

NARDINI, Mirella; FODDAI, Maria Stella. Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 2466, 2020a.

NARDINI, Mirella; FODDAI, Maria Stella. Phenolics profile and antioxidant activity of special beers. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 11, 2020b.

NARDINI, Mirella; GARAGUSO, Ivana. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 305, p. 125437, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619315523>. Acesso em: 14 dez. 2021.

NEGRI, Miryan Lane Soares. **SECAGEM DAS FOLHAS DE ESPINHEIRA-SANTA – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E INFLUÊNCIA NOS TEORES DE POLIFENÓIS, NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E**

NOS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS. 2007. 1–95 f. - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2007.

NEGRI, Myrian Lane Soares; POSSAMAI, João Carlos; NAKASHIMA, Tomoe.

Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, n. 2b, p. 553–556, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

NIERO, Rivaldo; DE ANDRADE, Sérgio Faloni; CECHINEL FILHO, Valdir. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 17, n. 18, p. 1851–1871, 2011. Disponível em:

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=17&issue=18&spage=1851>.

NIU, Chengtuo *et al.* Malt derived proteins: Effect of protein Z on beer foam stability. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 25, p. 21–27, 2018. Disponível em: Acesso em: 29 nov. 2022.

NUNES FILHO, Roberto Campos *et al.* Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 365, 2021.

OLDONI, Tatiane Luiza Cadorin *et al.* Moringa oleifera leaves from Brazil: Influence of seasonality, regrowth age and, region in biochemical markers and antioxidant potential. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 104206, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535222005226>.

OLIVEIRA, Pedro Henrique Ramos de. Fenol (CAS 108-95-2). **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 7, p. 1579–1593, 2015. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/966/600>. Acesso em: 26 nov. 2022.

PALMER, John J. **How to Brew**. 3. ed. [S. l.]: Brewers Publications, 2006.

PAYÁ, A. L. *et al.* PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL ADICIONADA DE AVEIA (*Avena sativa*). **Revista Engenharia em Ação UniToledo**, [s. l.], v. 4, p. 52–66, 2019. Disponível em: <http://www.ojs.toledo.br/index.php/engenharias/article/view/3505>.

RANI, Heena; BHARDWAJ, Rachana D. Quality attributes for barley malt: “The backbone of beer”. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 3322–3340, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15858>.

RE, Roberta *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, [s. l.], v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>.

ROCHA, Filomena. A cultura do lúpulo. [s. l.], 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/269710275>.

SANTOS-OLIVEIRA, Ralph; COULAUD-CUNHA, Simone; COLAÇO, Waldeciro. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, n. 2b, p. 650–659, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

ŠAVEL, Jan *et al.* Interpolation formulas for Balling’s alcohol factors. **KVASNY PRUMYSL**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 239–244, 2020. Disponível em: <http://www.kvasnyprumysl.eu/index.php/kp/article/view/210>.

- ŠAVEL, Jan; KOŠIN, Petr; BROŽ, Adam. Balling alcohol factors from the perspective of contemporary brewing. **Kvasny Prumysl**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 120–128, 2015. Disponível em: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2015015.html>.
- SAVI, Aline *et al.* Bioactive compounds from *Syzygium malaccense* leaves: optimization of the extraction process, biological and chemical characterization. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 42, p. e46773, 2020. Disponível em: <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/46773>.
- SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Em: METHODS IN ENZYMOLOGY*. [S. l.: s. n.], 1999. p. 152–178. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>.
- SIQUEIRA, P. BOLINI, H. MACEDO, G. O Processo de Fabricação da Cerveja e Seus Efeitos na Presença de Polifenóis. **Rev. Alim. Nutr**, [s. l.], 2008.
- SOHRABVANDI, S; MORTAZAVIAN, A.M.; REZAEI, K. Health-Related Aspects of Beer: A Review. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 350–373, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ljfp20>. Acesso em: 6 out. 2022.
- SORBO, Amanda; BROETTO, Fernando. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES EM CERVEJAS TIPO PILSEN SUPLEMENTADAS COM POLPA DE MARACUJÁ. **ENERGIA NA AGRICULTURA**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 441–446, 2019.
- STRONG, Gordon; ENGLAND, Kristen. **2021 Style Guidelines - Beer Style Guidelines**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: www.bjcp.org.
- TEIXEIRA, D. F. *et al.* Panorama of Quality of Espinheira-Santa Samples from Local Productive Arrangements and Local Stores of Rio De Janeiro Assayed By Pharmacopoeial Methods And Principal Component Analysis. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 194–209, 2018. Disponível em: http://rvq.s bq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=870&nomeArquivo=v10n1a16.pdf.
- TERLETSKAYA, Nina v. *et al.* The Influence of Abiotic Stress Factors on the Morphophysiological and Phytochemical Aspects of the Acclimation of the Plant *Rhodiola semenowii* Boriss. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1196, 2021.
- TIBERTI, Luciana A. *et al.* Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [s. l.], v. 846, n. 1–2, p. 378–384, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023206007562>.
- TRICASE, Caterina *et al.* Economic Analysis of the Barley Market and Related Uses. *Em: GRASSES AS FOOD AND FEED*. [S. l.]: IntechOpen, 2018.
- VANDERHAEGEN, B *et al.* The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 357–381, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605000865>.
- VERMERRIS, Wilfred; NICHOLSON, Ralph. **Phenolic Compound Biochemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. *E-book*. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5164-7>.
- WANG, Jiajing *et al.* Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 23, p. 6444–6448, 2016. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1601465113>.

anexo A - Tabela de referência para a pressão empregada na carbonatação forçada

Tabela para Carbonatação Forçada

		Pressão (gr e kg/cm²)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
°C	0,07	0,14	0,21	0,28	0,35	0,42	0,49	0,56	0,63	0,70	0,77	0,84	0,91	0,99	1,06	1,13	1,20	1,27	1,34	1,41	1,48	1,55	1,62	1,69	1,76	1,83	1,90	1,97	2,04	2,11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	0,1	0,182	0,27	0,36	0,45	0,54	0,63	0,72	0,81	0,90	0,99	1,08	1,17	1,26	1,35	1,44	1,53	1,62	1,71	1,80	1,89	1,98	2,07	2,16	2,25	2,34	2,43	2,52	2,61	2,70	2,79	2,88	2,97	3,06	3,15	3,24	3,33	3,42	3,51	3,60	3,69	3,78	3,87	3,96	4,05																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
	0,2	0,176	0,188	0,200	0,216	0,230	0,242	0,254	0,265	0,276	0,286	0,296	0,307	0,317	0,328	0,339	0,350	0,360	0,371	0,382	0,393	0,403	4,04	4,07	4,10	4,13	4,16	4,19	4,22	4,25	4,28	4,31	4,34	4,37	4,40	4,43	4,46	4,49	4,52	4,55	4,58	4,61	4,64	4,67	4,70	4,73	4,76	4,79	4,82	4,85	4,88	4,91	4,94	4,97	5,00	5,03	5,06	5,09	5,12	5,15	5,18	5,21	5,24	5,27	5,30	5,33	5,36	5,39	5,42	5,45	5,48	5,51	5,54	5,57	5,60	5,63	5,66	5,69	5,72	5,75	5,78	5,81	5,84	5,87	5,90	5,93	5,96	5,99	6,02	6,05	6,08	6,11	6,14	6,17	6,20	6,23	6,26	6,29	6,32	6,35	6,38	6,41	6,44	6,47	6,50	6,53	6,56	6,59	6,62	6,65	6,68	6,71	6,74	6,77	6,80	6,83	6,86	6,89	6,92	6,95	6,98	7,01	7,04	7,07	7,10	7,13	7,16	7,19	7,22	7,25	7,28	7,31	7,34	7,37	7,40	7,43	7,46	7,49	7,52	7,55	7,58	7,61	7,64	7,67	7,70	7,73	7,76	7,79	7,82	7,85	7,88	7,91	7,94	7,97	8,00	8,03	8,06	8,09	8,12	8,15	8,18	8,21	8,24	8,27	8,30	8,33	8,36	8,39	8,42	8,45	8,48	8,51	8,54	8,57	8,60	8,63	8,66	8,69	8,72	8,75	8,78	8,81	8,84	8,87	8,90	8,93	8,96	8,99	9,02	9,05	9,08	9,11	9,14	9,17	9,20	9,23	9,26	9,29	9,32	9,35	9,38	9,41	9,44	9,47	9,50	9,53	9,56	9,59	9,62	9,65	9,68	9,71	9,74	9,77	9,80	9,83	9,86	9,89	9,92	9,95	9,98	10,01	10,04	10,07	10,10	10,13	10,16	10,19	10,22	10,25	10,28	10,31	10,34	10,37	10,40	10,43	10,46	10,49	10,52	10,55	10,58	10,61	10,64	10,67	10,70	10,73	10,76	10,79	10,82	10,85	10,88	10,91	10,94	10,97	11,00	11,03	11,06	11,09	11,12	11,15	11,18	11,21	11,24	11,27	11,30	11,33	11,36	11,39	11,42	11,45	11,48	11,51	11,54	11,57	11,60	11,63	11,66	11,69	11,72	11,75	11,78	11,81	11,84	11,87	11,90	11,93	11,96	11,99	12,02	12,05	12,08	12,11	12,14	12,17	12,20	12,23	12,26	12,29	12,32	12,35	12,38	12,41	12,44	12,47	12,50	12,53	12,56	12,59	12,62	12,65	12,68	12,71	12,74	12,77	12,80	12,83	12,86	12,89	12,92	12,95	12,98	13,01	13,04	13,07	13,10	13,13	13,16	13,19	13,22	13,25	13,28	13,31	13,34	13,37	13,40	13,43	13,46	13,49	13,52	13,55	13,58	13,61	13,64	13,67	13,70	13,73	13,76	13,79	13,82	13,85	13,88	13,91	13,94	13,97	14,00	14,03	14,06	14,09	14,12	14,15	14,18	14,21	14,24	14,27	14,30	14,33	14,36	14,39	14,42	14,45	14,48	14,51	14,54	14,57	14,60	14,63	14,66	14,69	14,72	14,75	14,78	14,81	14,84	14,87	14,90	14,93	14,96	14,99	15,02	15,05	15,08	15,11	15,14	15,17	15,20	15,23	15,26	15,29	15,32	15,35	15,38	15,41	15,44	15,47	15,50	15,53	15,56	15,59	15,62	15,65	15,68	15,71	15,74	15,77	15,80	15,83	15,86	15,89	15,92	15,95	15,98	16,01	16,04	16,07	16,10	16,13	16,16	16,19	16,22	16,25	16,28	16,31	16,34	16,37	16,40	16,43	16,46	16,49	16,52	16,55	16,58	16,61	16,64	16,67	16,70	16,73	16,76	16,79	16,82	16,85	16,88	16,91	16,94	16,97	17,00	17,03	17,06	17,09	17,12	17,15	17,18	17,21	17,24	17,27	17,30	17,33	17,36	17,39	17,42	17,45	17,48	17,51	17,54	17,57	17,60	17,63	17,66	17,69	17,72	17,75	17,78	17,81	17,84	17,87	17,90	17,93	17,96	17,99	18,02	18,05	18,08	18,11	18,14	18,17	18,20	18,23	18,26	18,29	18,32	18,35	18,38	18,41	18,44	18,47	18,50	18,53	18,56	18,59	18,62	18,65	18,68	18,71	18,74	18,77	18,80	18,83	18,86	18,89	18,92	18,95	18,98	19,01	19,04	19,07	19,10	19,13	19,16	19,19	19,22	19,25	19,28	19,31	19,34	19,37	19,40	19,43	19,46	19,49	19,52	19,55	19,58	19,61	19,64	19,67	19,70	19,73	19,76	19,79	19,82	19,85	19,88	19,91	19,94	19,97	20,00	20,03	20,06	20,09	20,12	20,15	20,18	20,21	20,24	20,27	20,30	20,33	20,36	20,39	20,42	20,45	20,48	20,51	20,54	20,57	20,60	20,63	20,66	20,69	20,72	20,75	20,78	20,81	20,84	20,87	20,90	20,93	20,96	20,99	21,02	21,05	21,08	21,11	21,14	21,17	21,20	21,23	21,26	21,29	21,32	21,35	21,38	21,41	21,44	21,47	21,50	21,53	21,56	21,59	21,62	21,65	21,68	21,71	21,74	21,77	21,80	21,83	21,86	21,89	21,92	21,95	21,98	22,01	22,04	22,07	22,10	22,13	22,16	22,19	22,22	22,25	22,28	22,31	22,34	22,37	22,40	22,43	22,46	22,49	22,52	22,55	22,58	22,61	22,64	22,67	22,70	22,73	22,76	22,79	22,82	22,85	22,88	22,91	22,94	22,97	23,00	23,03	23,06	23,09	23,12	23,15	23,18	23,21	23,24	23,27	23,30	23,33	23,36	23,39	23,42	23,45	23,48	23,51	23,54	23,57	23,60	23,63	23,66	23,69	23,72	23,75	23,78	23,81	23,84	23,87	23,90	23,93	23,96	23,99	24,02	24,05	24,08	24,11	24,14	24,17	24,20	24,23	24,26	24,29	24,32	24,35	24,38	24,41	24,44	24,47	24,50	24,53	24,56	24,59	24,62	24,65	24,68	24,71	24,74	24,77	24,80	24,83	24,86	24,89	24,92	24,95	24,98	25,01	25,04	25,07	25,10	25,13	25,16	25,19	25,22	25,25	25,28	25,31	25,34	25,37	25,40	25,43	25,46	25,49	25,52	25,55	25,58	25,61	25,64	25,67	25,70	25,73	25,76	25,79	25,82	25,85	25,88	25,91	25,94	25,97	26,00	26,03	26,06	26,09	26,12	26,15	26,18	26,21	26,24	26,27	26,30	26,33	26,36	26,39	26,42	26,45	26,48	26,51	26,54	26,57	26,60	26,63	26,66	26,69	26,72	26,75	26,78	26,81	26,84	26,87	26,90	26,93	26,96	26,99	27,02	27,05	27,08	27,11	27,14	27,17	27,20	27,23	27,26	27,29	27,32	27,35	27,38	27,41	27,44	27,47	27,50	27,53	27,56	27,59	27,62	27,65	27,68	27,71	27,74	27,77	27,80	27,83	27,86	27,89	27,92	27,95	27,98	28,01	28,04	28,07	28,10	28,13	28,16	28,19	28,22	28,25	28,28	28,31	28,34	28,37	28,40	28,43	28,46	28,49	28,52	28,55	28,58	28,61	28,64	28,67	28,70	28,73	28,76	28,79	28,82	28,85	28,88	28,91	28,94	28,97	29,00	29,03	29,06	29,09	29,12	29,15	29,18	29,21	29,24	29,27	29,30	29,33	29,36	29,39	29,42	29,45	29,48	29,51	29,54	29,57	29,60	29,63	29,66	29,69	29,72	29,75	29,78	29,81	29,84	29,87	29,90	29,93	29,96	29,99	30,02	30,05	30,08	30,11	30,14	30,17	30,20	30,23	30,26	30,29	30,32	30,35	30,38	30,41	30,44	30,47	30,50	30,53	30,56	30,59	30,62	30,65	30,68	30,71	30,74	30,77	30,80	30,83	30,86	30,89	30,92	30,95	30,98	31,01	31,04	31,07	31,10	31,13	31,16	31,19	31,22	31,25	31,28	31,31	31,34	31,37	31,40	31,43	31,46	31,49	31,52	31,55	31,58	31,61	31,64	31,67	31,70	31,73	31,76	31,79	31,82	31,85	31,88	31,91	31,94	31,97	32,00	32,03	32,06	32,09	32,12	32,15	32,18	32,21	32,24	32,27	32,30	32,33	32,36	32,39	32,42	32,45	32,48	32,51	32,54	32,57	32,60	32,63	32,66	32,69	32,72	32,75	32,78	32,81	32,84	32,87	32,90	32,93	32,96	32,99	33,02	33,05	33,08	33,11	33,14	33,17	33,20	33,23	33,26	33,29	33,32	33,35	33,38	33,41	33,44	33,47	33,50	33,53	33,56	33,59	33,62	33,65	33,68	33,71	33,74	33,77	33,80	33,83	33,86	33,89	33,92	33,95	33,98	34,01	34,04	34,07	34,10	34,13	34,16	34,19	34,22	34,25	34,28	34,31	34,34	34,37	34,40	34,43	34,46	34,49	34,52	34,55	34,58	34,61	34,64	34,67	34,70	34,73	34,76	34,79	34,82	34,85	34,88	34,91	34,94	34,97	35,00	35,03	35,06	35,09	35,12	35,15	35,18	35,21	35,24	35,27	35,30	35,33	35,36	35,39	35,42	35,45	35,48	35,51	35,54	35,57	35,60	35,63	35,66	35,69	35,72	35,75	35,78	35,81	35,84	35,87	35,90	35,93	35,96	35,99	36,02	36,05	36,08	36,11	36,14	36,17	36,20	36,23	36,26	36,29	36,32	36,35	36,38	36,41	36,44	36,47	36,50	36,53	36,56	36,59	36,62	36,65	36,68	36,71	36,74	36,77	36,80	36,83	36,86	36,89	36,92	36,95	36,98	37,01	37,04	37,07	37,10	37,13	37,16	37,19	37,22	37,25	37,28	37,31	37,34	37,37	37,40	37,43	37,46	37,49	37,52	37,55	37,58	37,61	37,64	37,67</

**anexo B - Quadro da conversão da densidade relativa a 20°C/20 °C em
porcentagem de extrato**

Densidade Relativa a 20°C/20°C	g extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20°C	g extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20°C/20°C	g extrato em 100 g de solução
1	0	1,00605	1,55	1,01213	3,1
1,0002	0,05	1,00624	1,6	1,01233	3,15
1,00039	0,1	1,00644	1,65	1,01253	3,2
1,00059	0,15	1,00663	1,7	1,01273	3,25
1,00078	0,2	1,00683	1,75	1,01292	3,3
1,00098	0,25	1,00702	1,8	1,01312	3,35
1,00117	0,3	1,00722	1,85	1,01332	3,4
1,00137	0,35	1,00742	1,9	1,01352	3,45
1,00156	0,4	1,00761	1,95	1,01371	3,5
1,00176	0,45	1,00781	2	1,01391	3,55
1,00195	0,5	1,00799	2,05	1,01411	3,6
1,00214	0,55	1,0082	2,1	1,01431	3,65
1,00234	0,6	1,0084	2,15	1,00451	3,7
1,00254	0,65	1,00859	2,2	1,01471	3,75
1,00273	0,7	1,00879	2,25	1,0149	3,8
1,00293	0,75	1,00897	2,3	1,0151	3,85
1,00312	0,8	1,00918	2,35	1,0153	3,9
1,00332	0,85	1,00938	2,4	1,0155	3,95
1,00351	0,9	1,00957	2,45	1,0157	4
1,00371	0,95	1,00977	2,5	1,0159	4,05
1,0039	1	1,00997	2,55	1,01609	4,1
1,0041	1,05	1,01016	2,6	1,01629	4,15
1,00429	1,1	1,01036	2,65	1,01649	4,2
1,00449	1,15	1,01056	2,7	1,01669	4,25
1,00468	1,2	1,01075	2,75	1,01689	4,3
1,00488	1,25	1,01095	2,8	1,01709	4,35
1,00507	1,3	1,01115	2,85	1,01729	4,4
1,00527	1,35	1,01134	2,9	1,01749	4,45
1,00546	1,4	1,01154	2,95	1,01769	4,5
1,00566	1,45	1,01174	3	1,01789	4,55
1,00585	1,5	1,01194	3,05	1,01808	4,6
1,01828	4,65	1,02511	6,35	1,03201	8,05
1,01848	4,7	1,02531	6,4	1,03221	8,1
1,01868	4,75	1,02551	6,45	1,03242	8,15
1,01888	4,8	1,02571	6,5	1,03262	8,2
1,01908	4,85	1,02592	6,55	1,03263	8,25
1,01928	4,9	1,02612	6,6	1,03283	8,3
1,01948	4,95	1,02632	6,65	1,03324	8,35

Densidade Relativa a 20°C/20°C	g extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20/20°C	g extrato em 100 g de solução	Densidade Relativa a 20°C/20°C	g extrato em 100 g de solução
1,01969	5	1,02652	6,7	1,03344	8,4
1,01988	5,05	1,02672	6,75	1,03365	8,45
1,02008	5,1	1,02693	6,8	1,03385	8,5
1,02028	5,15	1,02713	6,85	1,03406	8,55
1,02048	5,2	1,02733	6,9	1,03426	8,6
1,02068	5,25	1,02753	6,95	1,03447	8,65
1,02088	5,3	1,02774	7	1,03467	8,7
1,02108	5,35	1,02794	7,05	1,03488	8,75
1,02128	5,4	1,02814	7,1	1,03503	8,8
1,02148	5,45	1,02835	7,15	1,03529	8,85
1,02169	5,5	1,02855	7,2	1,03549	8,9
1,02189	5,55	1,02875	7,25	1,0357	8,95
1,02209	5,6	1,02896	7,3	1,03591	9
1,02229	5,65	1,02916	7,35	1,03611	9,05
1,02249	5,7	1,02936	7,4	1,03632	9,1
1,02269	5,75	1,02956	7,45	1,03652	9,15
1,02289	5,8	1,02977	7,5	1,03673	9,2
1,02309	5,85	1,02997	7,55	1,03693	9,25
1,02329	5,9	1,03018	7,6	1,03714	9,3
1,02349	5,95	1,03038	7,65	1,03735	9,35
1,0237	6	1,03058	7,7	1,03755	9,4
1,0239	6,05	1,03079	7,75	1,03776	9,45
1,0241	6,1	1,03099	7,8	1,03796	9,5
1,0243	6,15	1,03119	7,85	1,03817	9,55
1,0245	6,2	1,0314	7,9	1,03838	9,6
1,0247	6,25	1,0316	7,95	1,03858	9,65
1,0249	6,3	1,03181	8	1,03879	9,7
1,03909	9,75	1,03941	9,85	1,03982	9,95
1,03929	9,8	1,03962	9,9	1,04003	10

Fonte: (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).