

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

KEYLA TORRES FONSECA

CERVEJA ARTESANAL ADICIONADA DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.):
Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos

Recife

2020

KEYLA TORRES FONSECA

CERVEJA ARTESANAL ADICIONADA DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.):
Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Nutrição na área de Ciência dos Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco.
Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador (a): Prof^ª Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Coorientador (a): Prof^º Dr. Hilário Jorge Bezerra De Lima Filho

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Elaine Freitas, CRB4: 1790

F676c	<p>Fonseca, Keyla Torres. Cerveja artesanal adicionada de hibisco (<i>hibiscus sabdariffa</i> L.): determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos/ Keyla Torres Fonseca. – 2020. 51 f.</p> <p>Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020. Inclui referências.</p> <p>1. Cerveja. 2. Polifenóis. 3. Compostos Fitoquímicos. 4. Antocianinas. 5. Hibiscus. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Título.</p> <p>612.3 CDD (23.ed.)</p>
	UFPE (CCS 2020 - 083)

KEYLA TORRES FONSECA

CERVEJA ARTESANAL ADICIONADA DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.):

Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Nutrição na área de ciência dos alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Departamento de Nutrição - UFPE

Marcos Antônio Barbosa de Lima
Departamento de Biologia - UFRPE

Sarah Romini de Lima Basto
Secretaria de Educação de Paulista

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as conquistas e por tudo o que sou hoje, por sempre guiar e iluminar meu caminho, me proporcionando as melhores coisas dentro do tempo certo e conforme a Sua vontade.

Agradeço aos meus pais, Luiza e Mauricio, e minha vó Lourdes que sempre foram grandes incentivadores da minha educação, sempre fizeram tudo o que podiam para me ofertar o melhor e sempre acreditaram em mim. Sou muito grata a vocês e espero um dia poder retribuir por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida. À minha irmã, Maria Júlia, que tanto me ajudou seja me acompanhando nos momentos de escrita ou me tranquilizando nos momentos de angústia. Aos meus tios, que sempre me incentivaram e torceram pelas minhas conquistas.

Agradeço ao meu namorado Lucas, por todo apoio, paciência e suporte ao longo desses anos, por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar a ir atrás dos meus sonhos.

À minha orientadora, Thayza Stamford, agradeço por todos os ensinamentos, pelo acolhimento, suporte e paciência ao longo desses 2 anos.

À minha turma de mestrado, meus amigos e futuros mestres, Nathália Rocha, Allan Victor, Mariana Mesquita, Walkeane Carneiro, Isabella Teodora, Regina Escorel, e em especial, Wenícios Chaves, que me acompanha desde a graduação e não mediu esforços para ajudar não só a mim, mas a turma toda, e aos demais alunos, vocês todos foram essenciais para que conseguíssemos terminar essa missão. Desde os nossos encontros necessários para desopilar a mente, até as sessões coletivas de terapia ao longo dos anos. Ninguém soltou a mão de ninguém e vou levar vocês comigo pro resto da vida!

Ao meu co-orientador Hilário Bezerra, à Diego Guedes, Renan e Pammello, do Laboratório de Engenharia Química da UNICAP por terem me recebido, me acolhido e me ajudado nos momentos mais tensos do mestrado.

À João Pedro Hipólito e Cláudio Galdino, que foram meus mentores no mundo cervejeiro, sem vocês eu não teria conseguido dar início a essa pesquisa.

Às minhas amigas, que apesar da minha ausência em muitos momentos nesses últimos dois anos, sempre torceram por mim e me apoiaram.

À todos os funcionários do Programa de Pós Graduação em Nutrição e a todos que contribuíram direta e indiretamente com esse trabalho.

RESUMO

Cerveja é uma bebida fermentada que apresenta diversos ingredientes que lhes confere características sensoriais e de conservação. O *Hibiscus sabdariffa* L é fonte de compostos fenólicos e antocianinas, e vem sendo explorado pela indústria alimentícia devido a sua capacidade antioxidante. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi formular cerveja artesanal do tipo ale adicionada de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). Para a incorporação do hibisco a cerveja foi realizado um planejamento fatorial de 2^3 para avaliar as condições de extração propostas, sendo elas: concentração de hibisco, tempo e temperatura de extração. Posteriormente, foram avaliadas nas cervejas a presença de compostos fenólicos através da Contagem Total de Polifenóis e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e Poder Redutor. Ademais, a caracterização da cerveja foi realizada conforme os padrões de teor alcoólico, cor, amargor, extrato real e primitivo e pH. Quanto a caracterização, a cerveja exibiu um teor alcoólico de 4,7%, foi classificada como cerveja do tipo Extra pelo extrato primitivo e como cerveja escura pelo EBC. O IBU apresentou variação de 14,6 a 21,9. A partir dos resultados, observou-se que a atividade antioxidante e concentração de polifenóis foram proporcionalmente elevadas quando aplicados maiores tempo, temperatura e concentração nas formulações. Os gráficos de superfície apontaram que valores superiores ao tempo e à temperatura (10 minutos e 60 °C) apresentam influência negativa, podendo causar oxidação dos compostos fenólicos presentes na bebida. Concluiu-se que a adição de hibisco em formulações de cerveja levou ao aumento da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos presentes nas cervejas.

Palavras-chave: Cerveja. Polifenóis. Compostos Fitoquímicos. Antocianinas. Hibiscus.

ABSTRACT

Beer is a fermented drink that has several ingredients that provide sensory and conservation characteristics. *Hibiscus sabdariffa L.* is a source of phenolic compounds and anthocyanins, and has been explored by the food industry due to its antioxidant capacity. Therefore, the objective of the present study was to formulate an ale type beer added with *Hibiscus* (*Hibiscus sabdariffa L.*). For the *Hibiscus* incorporation in beer, a factorial design of 2^3 was carried out to evaluate the requested extraction conditions, which are: hibiscus concentration, extraction time and temperature. Subsequently, the presence of phenolic compounds in the beers was evaluated through the Total Polyphenol Content and antioxidant activity by the methods of DPPH, ABTS and Reducing Power. In addition, a characterization of the beer was carried out according to the standards of alcohol content, color, bitterness, real and primitive extract and pH. As for the characterization, a beer exhibited in 4.7% alcohol content, was used as Extra type beer by the primitive extract and as dark beer by the EBC. The IBU ranges from 14.6 to 21.9. From the results, it can be considered that the antioxidant activity and the concentration of polyphenols are proportionally high when longer times, temperatures and concentrations are used in the formulations. The surface graphs point to values above time and temperature (10 minutes and 60 ° C), causing a negative influence, which may cause oxidation of the phenolic compounds present in the drink. It was concluded that the addition of hibiscus in beer formulations leads to an increase in antioxidant activity and phenolic compounds present in beers.

Keywords: Beer. Polyphenols. Phytochemicals. Anthocyanins. Hibiscus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Classificação das cervejas segundo o tipo de fermentação.....	15
Figura 1 –	Malte de cevada.....	16
Figura 2 –	Cálices de Hibisco.....	20
Quadro 2 –	Matriz do planejamento fatorial (2^3) da adição das infusões do hibisco com diferentes temperaturas e tempo de extração.....	25
Quadro 3 –	Descrição da formulação da cerveja.....	26
Figura 3 –	Fluxograma do processo produtivo.....	27
Quadro 4 –	Classificação da cerveja segundo extrato primitivo.....	30
Figura 4 –	Diagrama de pareto evidenciando a relevância das variáveis independentes (quantidades de hibisco, temperatura de extração e tempo de extração) com a atividade antioxidante realizada através do método DPPH, ABTS e PR, e contagem total de polifenóis (CTP).....	39
Figura 5 –	Gráficos de superfície de resposta do efeito da atividade antioxidante pelo método DPPH (A), ABTS (B) e Poder Redutor (RP) (C) e Contagem de Total de Fenólicos (D) relacionando a Concentração dos Cálices de Hibisco e Temperatura de Extração; ao Tempo de Extração e Quantidade de Hibisco; e Tempo e Temperaturas de Extração, respectivamente.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização das cervejas segundo os parâmetros de amargor (IBU), cor (EBC), extrato real, extrato primitivo e pH comparados com o padrão.....	34
Tabela 2 –	Resposta das variáveis independentes com as atividades antioxidantes e polifenóis totais.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ABRACERVA	Associação Brasileira de Cervejarias Artesanais
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
EBC	<i>European Brewing Convention</i>
IBU	<i>International Bitterness United</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
DPPH	(2,2–difnil-1-picrihidrazila)
ABTS	2,2 Azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate)
PR	Poder Redutor
CTP	Contagem Total de Polifenóis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	MERCADO CERVEJEIRO.....	14
2.2	INSUMOS DA CERVEJA.....	15
2.2.1	Água.....	15
2.2.2	Malte.....	15
2.2.3	Lúpulo.....	16
2.2.4	Levedura.....	17
2.2.5	Adjuntos e Especiarias.....	17
2.3	PROCESSO PRODUTIVO.....	18
2.4	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. E SUAS PROPRIEDADES.....	19
3	HIPOTÉSE.....	22
4	OBJETIVOS.....	23
4.1	OBJETIVO GERAL.....	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5	METODOLOGIA.....	24
5.1	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS... ..	24
5.2	OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA.....	26
5.3	ELABORAÇÃO DA CERVEJA.....	26
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA.....	28
5.4.1	Gradação alcoólica.....	28
5.4.2	Determinação de pH.....	28
5.4.3	Determinação de Cor.....	28
5.4.4	Determinação de Amargor.....	29
5.4.5	Extrato Real.....	29
5.4.6	Extrato primitivo ou original.....	29

5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
5.5.1	Método DPPH.....	30
5.5.2	Método ABTS	31
5.5.3	Poder Redutor	31
5.5.4	Determinação do Conteúdo Total de Polifenóis (CTP).....	31
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA	33
6.2	RESPOSTA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DA CERVEJA A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL.	35
7	CONCLUSÃO	43
7.1	PERSPECTIVAS	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A Cerveja é definida pela Legislação Brasileira como “bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”. A cerveja poderá ser adicionada de insumos de origem vegetal, ou de origem animal, de coadjuvante de tecnologia e de aditivo, a serem regulamentados em atos específicos (BRASIL, 2019). A classificação das cervejas se dá de acordo com o processo de fermentação, sendo separadas em dois tipos: as *Lagers*, ou de baixa fermentação; e as *Ales*, ou de alta fermentação, e ainda existem as cervejas de fermentação espontânea conhecida como Lambics.

Cerveja é rica em carboidratos, aminoácidos, minerais, vitaminas e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos presentes na bebida são advindos do malte e do lúpulo, e apresentam grande influência na estabilidade de flavor, cor e amargor (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013). Também são considerados uma fonte importante de antioxidante presente na cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2006). Vários fatores influenciam a atividade antioxidante das cervejas, como a seleção dos maltes, o tipo de lúpulo, fermento utilizado e o processo de fabricação. Geralmente, as cervejas do tipo *ale* apresentam maior atividade antioxidante do que as *Lager* devido as combinações de malte utilizados (GRANATO et al., 2011), conferindo maior quantidade de fenólicos presente nas bebidas.

Durante o processo de fabricação, o grande desafio para os cervejeiros é manter a estabilidade do *flavor*, que está relacionada ao período de vida útil da cerveja (FUMI et al., 2011). Um dos principais fatores que interferem no sabor é a oxidação ocorrida durante o processo de fabricação. Apesar dos diversos tipos de antioxidantes naturais e sintéticos já utilizados pela indústria, como flavonoides, sulfitos e ascorbato, pesquisadores têm investigado novos possíveis compostos naturais que desempenhem tal função antioxidante, minimizando o uso de aditivos químicos (ZHAO et al., 2010). Nesse sentido, a adição de frutas e plantas podem contribuir com a formação de flavors e aromas e aumento dos compostos bioativos presentes na bebida (LEITAO et al, 2012; DUCRUET et al, 2017).

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta pertencente à classe das Dicotiledôneas, família das Malváceas e gênero *Hibiscus* (ANDZI BARHÉ; FEUYA TCHOUYA, 2016). É reconhecida como planta medicinal e como fonte de compostos fenólicos e antocianinas (ALI

et al, 2005; ZHANG et al, 2011; AL-HASHIMI, 2012), além de apresentar potencial antioxidante em produtos alimentícios e ser fonte natural de antioxidantes (HIRUNPANICH et al, 2005; OBOUAYEBA et al, 2014).

A sua composição apresenta altas concentrações de antocianinas, responsáveis pela sua cor vermelha intensa e dos seus efeitos benéficos na saúde, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatório, potencial antibacteriano, antitumoral e hepatoprotetor, que já são sedimentados na literatura (FRIMPONG et al., 2014; LIU et al., 2016). Além dessas características, também apresentam aplicações na tecnologia dos alimentos para aperfeiçoar produtos na indústria alimentícia.

Nesse contexto, com o crescente interesse dos produtores de novas opções de cervejas artesanais e considerando os achados na literatura sobre as propriedades de atividades antioxidante do hibisco, além de sua utilização para elaboração de vários produtos, o presente estudo se propõe a elaborar uma cerveja artesanal do tipo *Ale* acrescida dos compostos fenólicos do hibisco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MERCADO CERVEJEIRO

Segundo a Associação Brasileira de Cerveja Artesanal (ABRACERVA), no ano de 2018, houve o crescimento significativo do número de cervejarias inscritas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram criadas cerca de 210 novas cervejarias, mais do que 4 cervejarias novas por semana, tendo o Brasil alcançado o número de 889 registradas. Estima-se que a produção de cerveja artesanal represente 2,5 a 2,7% do volume de produção total de 14,1 bilhões de litros, equivalendo a aproximadamente de 352 a 380 milhões de litros ano fabricados pelas cervejarias artesanais independentes (ABRACERVA, 2019).

Pernambuco é o estado com maior número de cervejarias do Nordeste e tem capacidade de se tornar um polo na região. O segmento está em expansão devido a grande procura pelos produtos. Segundo registros do MAPA (2018), o estado de Pernambuco ocupa o oitavo lugar no ranking, com 10 cervejarias e aproximadamente dezesseis incubados registrados, também conhecidos como cervejarias ciganas, ou seja, aquelas que utilizam instalações de outros fabricantes para produzir suas marcas. (TSCHÁ, 2018). A escolha do consumidor por cervejas artesanais é direcionada por características, como variedades no sabor e aroma (SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN; REZAEI, 2012; AQUILANI et al., 2015).

As cervejarias artesanais de maior atividade no Brasil são as pequenas e as microcervejarias, cuja produção é realizada em pequena escala e muitas vezes relacionada a negócios familiares. Esse mercado tem como público-alvo os jovens-adultos, faixa etária entre 26 e 39 anos, em sua maioria de classe média (ARAUJO et al., 2016). Dentre os principais atributos sensoriais explorados pela bebida artesanal, os novos sabores e aromas obtidos destacam-se pela seleção dos insumos e pela sua forma de produção (GADOTTI, et al., 2015). A ideologia do consumo de cervejas artesanais envolve questões históricas, culturais e o prazer de produzir e consumir cervejas, harmonizadas com gastronomia de qualidade, além de oportunizar o desenvolvimento de bebidas com características individuais de cada cervejeiro (FERREIRA et al., 2011).

As cervejas do tipo *Ale* possuem diversas origens, como as inglesas, sendo elas: Bitter, Pale Ale, Porter; as irlandesas, como a Stout; as alemãs, como Weizebier, Altbier, Kolsch; e a belga, Trappiste (VENTURINI; CEREDA, 2008) as Lager tem origem alemã, como as Munchen, Bock, Malzbier e Rauchbier; e na República Tcheca, conhecida como Pilsen ou Pilsener. Além dessas, existe as cervejas de fermentação espontânea, de origem belga,

conhecidas como: Lambics, Gueuze (REINOLD, 2011; VENTURINI; CEREDA, 2008), conforme descrito no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Classificação das cervejas segundo o tipo de fermentação

CLASSIFICAÇÃO DAS CERVEJAS					
ALE			LAGER		Fermentação espontânea
Inglesas	Irlandesas	Alemãs	Alemãs	Tchecas	
Bitter Pale Ale Porter	Stout	Weizebier Altbier Kolsch	Munchen Bock Malzbie Rauchbier	Pilsen ou Pilsner	Lambics Gueuze

2.2 INSUMOS DA CERVEJA

2.2.1 Água

A água é um dos componentes mais importantes na produção da cerveja. Deve apresentar boa qualidade, uma vez que, compõe cerca de 92 a 95% do produto. Na sua composição existem sais dissolvidos e compostos orgânicos presentes que podem influenciar diretamente nos processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação, afetando a qualidade da cerveja (ALMEIDA; SILVA, 2005). No geral, a água ideal para fabricação de cerveja apresenta as seguintes características: pH entre 6,5 e 7,0; menos de 100 mg L⁻¹ de carbonato de cálcio ou magnésio; traços de magnésio, de preferência na forma de sulfatos; de 250 a 500 mg L⁻¹ de sulfato de cálcio; de 200 a 300 mg L⁻¹ de cloreto de sódio; e menos de 1 mg L⁻¹ de ferro (AQUARONE et al, 1983).

2.2.2 Malte

O principal cereal utilizado na maltagem é a cevada, gramínea da espécie *Hondeum vulgare* L. (VENTURINI FILHO, 2008). Alguns países utilizam outros cereais como o sorgo, milho e trigo para produzirem maltes (HOUGH et al, 1971). O termo malte é utilizado para nomear um cereal que passou por processo de germinação em condições adequadas. O malte de cevada pode ser obtido através de três etapas: maceração, germinação e secagem (BRUNELLI, 2014). O processo de maceração do malte é essencial para liberação das enzimas amilolíticas, sendo elas a alfa e a beta-amilase, responsáveis pela fermentação do mosto.

Enquanto a germinação, é responsável pela produção de enzimas que auxiliam o processo de fermentação (BRUNELLI, 2014; VIROLI, 2015).

O malte é o componente da cerveja que fornece carbono para a bebida e lhe atribui sabor, cor e participa na formação de espuma do produto (**Figura 1**). Também disponibiliza enzimas necessárias a quebra das grandes cadeias de polímeros, tais como os amidos e as proteínas presentes no próprio ingrediente (LEWIS e YOUNG, 2002; TOZETTO, 2017).

Figura 1- Malte de cevada



Fonte: Google

A cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis devido a quantidade considerável de compostos fenólicos presentes tanto no malte quanto no lúpulo. Cerca de 50 compostos fenólicos foram identificados na cerveja, sendo 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% são provenientes do lúpulo. Contudo, durante o processamento da cevada, esses compostos sofrem modificações e por isso não possuem caracterização definida quanto os derivados do lúpulo. Durante o processamento da cerveja, parte desses polifenóis sofrem alterações devido as altas temperaturas aos quais são submetidos. Dessa forma, à facilidade de oxidação e polimerização de vários compostos fenólicos (DE KEUKELEIRE, 2000; LUGASI, 2003; GERHAUSER, 2005).

2.2.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta dióica, ou seja, produz flores masculinas e femininas em diferentes plantas, pertencente à família das *Cannabinaceae*. Suas flores possuem

resinas e óleos, que quando extraídos conferem sabor e aroma na cerveja (OLIVEIRA, 2011). Dentre outras funções do lúpulo, podemos citar a sua capacidade antimicrobiana, permitindo maior segurança para o mosto e uma maior estabilidade da cerveja, reduzindo contaminantes que possam impedir a ação das leveduras durante a fermentação (ALMAGUER et al., 2014). Ainda possuem outras funções, como evitar a formação de espuma durante o processo da fervura (BRIGIDO; NETTO, 2006). Existem várias formas de comercialização do lúpulo, dentre elas: flores prensadas, pó, extrato e na forma de pallets (SACHS, 2001).

As principais substâncias do lúpulo no processo cervejeiro são os óleos essenciais, substâncias minerais, polifenóis e resinas amargas. São altamente voláteis, ocorrendo perda das de 96 a 98% no decorrer do processo cervejeiro, os óleos essenciais são responsáveis por conferir ao mosto e à cerveja o caráter aromático do lúpulo. Os polifenóis são ricos em taninos, protetores da cerveja por desempenharem um papel antimicrobiano. As resinas do lúpulo por sua vez, podem ser resinas brandas totais, que apresentam α -ácidos ou humulonas que após isomerização tornam-se solúveis e responsáveis pelo principal amargor da cerveja, e resinas duras, substâncias solúveis e responsáveis por um amargor (VENTURINI FILHO, 2010).

2.2.4 Levedura

Pertencentes ao Reino Fungi, as leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares, cuja função é transformar os açúcares presentes no mosto cervejeiro. Durante o processo de elaboração da cerveja, são comumente utilizadas duas espécies: *Saccharomyces uvarum*, responsável pela fermentação das cervejas do tipo *Lager* (baixa fermentação) e *Saccharomyces cerevisiae* que fazem a fermentação das cervejas do tipo *Ale* (alta fermentação). A fermentação dos açúcares presentes no mosto são responsáveis pelo teor alcoólico e pela concentração de gás carbônico presente na cerveja, sendo assim, quanto mais açúcar presente, maior será o teor alcoólico e a produção de gás carbônico (LEI; ZHAO; ZHAO, 2013).

2.2.5 Adjuntos e Especiarias

Adjuntos são definidos como todo ingrediente adicionado na cerveja além da água, malte, lúpulo e levedura. Normalmente são utilizados para conferir novos sabores, aromas, cores, ou até mesmo de baratear o produto. São comumente utilizados na produção como adjunto cervejeiro o milho, arroz, cevada, trigo e sorgo (VENTURINI FILHO, 2005).

A possibilidade de empregar extratos de frutas e plantas podem agregar valores nutricionais, criando aberturas para a produção e diversificação de estilos de cervejas, com novos sabores e aromas leves e refrescantes (D'AVILA et al., 2012). A utilização de frutas e especiarias como adjunto cervejeiro é uma prática antiga, sendo utilizada antes mesmo de o lúpulo ser considerado um dos ingredientes principais. Na Bélgica, é comum a utilização de frutas empregadas como insumo no processo de obtenção da cerveja, sendo reconhecida mundialmente nesse segmento (D'AVILA et al., 2012).

2.3 PROCESSO PRODUTIVO

O processo produtivo da cerveja é composto de algumas etapas, sendo elas: moagem do malte, mosturação ou brassagem, filtração do mosto, fervura do mosto, fermentação, maturação, carbonatação e envase (SANTOS, 2014). O processo de moagem tem como objetivo principal a quebra dos grãos para exposição do amido presente no interior do malte. Esse processo permite aumentar a superfície de contato da água com as enzimas, dentre elas a alfa e beta amilase, presente no malte que favorecem a hidrólise do amido, cujo objetivo é a transformação desse amido em açúcares, formando o mosto (GASTONI FILHO, 2010; CRUZ et al., 2008).

A mosturação ou brassagem é a mistura do malte moído com a água cervejeira no mosturador. Durante essa etapa o controle de tempo e temperatura, também conhecido como as rampas de temperatura, é essencial para que as reações bioquímicas desejadas no processo sejam realizadas (BUSCH, 2015). Em seguida é realizada a filtração do mosto cujo objetivo é separar a parte sólida ou o bagaço da parte líquida ou o mosto cervejeiro para dar início à fervura do mosto (BLEIER et al, 2013).

Durante a fase da fervura, ocorre a desnaturação proteica, concentração do mosto para atingir a densidade ideal para o tipo de cerveja, esterilização e escurecimento do mosto a partir da reação de *Maillard*, além da evaporação de compostos sulfurosos. Neste momento também é realizada a adição do lúpulo. A fervura confere a extração dos compostos amargos e aromáticos do lúpulo e formação dos constituintes do aroma e sabor (PAPAZIAN, 2014; VENTURINI FILHO, 2005)

O processo de fermentação é iniciado após a adição da levedura ao mosto já resfriado no fermentador. Durante essa etapa, as leveduras são responsáveis pela transformação dos açúcares

obtidos durante a mosturação em gás carbônico e etanol em condições ideais de temperatura e tempo (SCHMIDELL et al, 2001).

Após o período de fermentação, é iniciada a fase de maturação. Conforme descrito por MARTINS E FERREIRA (2013), o objetivo desta fase é o de refinar o sabor da cerveja através da redução dos compostos formados, tais como: diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico. Tais compostos podem trazer *off-flavors* para a cerveja, além de carbonatar parcialmente o produto, impedir a oxidação que pode afetar sensorialmente a bebida e clarificar o mosto através da deposição do fermento e outros conteúdos em suspensão.

Finalizado o processo de maturação, é realizado a carbonatação ou gaseificação da cerveja que pode ser realizada por injeção de CO₂, forma esta comumente utilizada pelas indústrias cervejeiras. Outra forma utilizada é através do *priming*, que consiste em formação de gases a partir da adição de açúcares fermentáveis nas garrafas para a produção de CO₂ realizado pelas leveduras restantes. Após esse processo, é realizado o envase da bebida em embalagens como latas, garrafas ou barris (MATOS, 2011).

2.4 *Hibiscus sabdariffa* L. E SUAS PROPRIEDADES

A utilização de infusões e chás vem sendo exploradas em diferentes setores da indústria, e o *Hibiscus sabdariffa* L. vem ganhando destaque devido a sua composição e propriedades funcionais (HIGGINBOTHAM et al, 2014). Existem cerca de 300 espécies de *Hibiscus sp.* Cultivadas e o *Hibiscus sabdariffa* L vem sendo amplamente utilizado devido ao seu conteúdo bioativo (SINDI et al, 2014).

O *Hibiscus sabdariffa* L., popularmente conhecida como hibisco, hibiscos, rosela, groselha, azedinha. É uma importante planta pertence à classe das Dicotiledôneas, família das Malváceas e gênero *Hibiscus*. Esta espécie é cultivada por suas fibras e cálices e inclui três genótipos diferentes: verde, vermelho, sendo o mais utilizado, e vermelho escuro (BARHÉ; TCHOUYA, 2016).

Os cálices do hibisco (**Figura 2**) têm sido utilizados para elaboração de produtos alimentícios, como chás, xaropes, geleias, vinhos e também utilizados como corantes alimentares naturais e para fabricação de medicamentos (BORRÁS-LINARES et al., 2015). Os principais constituintes do *H. sabdariffa* que possuem contexto farmacológico relevante são os ácidos orgânicos, polissacarídeos, flavonoides e as antocianinas (EGGENSPERGER; WILKER, 1996; MÜLLER; FRANZ, 1990).

As antocianinas são um grupo de compostos fenólicos encontrados em uma variedade de flores e frutas que apresentam coloração vermelho-arroxeadas e (MARTINS et al., 2016). tem sido utilizada como uma fonte alternativa para substituição de corantes sintéticos utilizados pela indústria alimentícia (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; BORRÁS-LINARES et al., 2015; IFIE et al., 2018) , além de apresentarem benefícios para o organismo como propriedades antioxidantes e antimicrobiana (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

Figura 2 - Cálices de Hibisco



Fonte: Google

Os compostos responsáveis pela cor vermelha desta planta são: delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo (BORRÁS-LINARES et al., 2015). Além do seu potencial de coloração, esses compostos possuem outras propriedades como, por exemplo, antioxidante, anti-inflamatório, potencial antibacteriano, antitumoral e hepatoprotetor, podendo atuar tanto como corantes naturais, como insumos promotores de saúde, despertando o interesse de pesquisadores com relação a sua aplicação na indústria alimentícia (LIU et al., 2016; VAGIRI; JENSEN, 2017).

Há preocupação da indústria com relação a extração desses compostos, uma vez que se espera o rendimento máximo de um composto com o mínimo de degradação. As antocianinas são solúveis em solventes polares e na presença de HCL ou ácidos orgânicos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Fatores como tempo e temperatura, influenciam na extração das antocianinas. Modelos matemáticos são utilizados para influência de efeitos isolados, bem como combinação de fatores, podendo maximizar extratos funcionais (ZHANG et al., 2006; PEDRO et al., 2016). O tratamento térmico é um fator que afeta a estabilidade das antocianinas, que são degradadas quando expostas a altas temperaturas. Elas também se mostram estáveis em

valores de pH ácido, porém com níveis de pH acima de 6, começam a apresentar perda de coloração (PATRAS et al., 2010).

Diante do exposto, o presente estudo busca avaliar os aspectos sensoriais e capacidade antioxidante em formulações de cerveja adicionada de chá de hibisco obtido em diferentes condições.

3 HIPOTÉSE

A adição da infusão dos cálices do hibisco na elaboração da cerveja artesanal do tipo *ale* aumentará o conteúdo de compostos fenólicos presentes na bebida, ampliando a atividade antioxidante e inibindo a formação dos *off-flavors*, além de contribuir com a coloração para a bebida.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Formular uma cerveja artesanal do tipo *ale* adicionada da infusão dos cálices do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) e avaliar a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a cerveja segundo os aspectos de graduação alcoólica, cor, amargor e extrato real e primitivo;
- Determinar a capacidade antioxidante da cerveja com a incorporação do hibisco;
- Avaliar o conteúdo fenólico presente na cerveja;
- Verificar as melhores condições de extração dos compostos fenólicos do hibisco.

5 METODOLOGIA

5.1 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS

Para o desenvolvimento da cerveja foi realizado um planejamento fatorial com desenho de 2^3 para avaliar as condições ideais de extração dos cálices do hibisco para obter a melhor resposta da atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos presentes nas formulações.

Foram considerados como variáveis independentes a concentração de hibisco (2g; 3,5g e 5g), a temperatura (30 °C, 45 °C e 60 °C) e o tempo de extração (5 minutos, 7,5 minutos e 10 minutos). Para as variáveis de resposta foram consideradas as determinações da atividade antioxidante: DPPH, ABTS, Poder Redutor (PR) e Contagem Total de Polifenóis (CTP). Os extratos obtidos no planejamento fatorial foram aplicados nas formulações de cervejas, conforme descrito no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Matriz do planejamento fatorial (2^3) da adição das infusões do hibisco com diferentes temperaturas e tempo de extração

ENSAIOS	Concentração de Hibisco (g/100mL)	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)
1	2 (-1)	30 (-1)	5 (-1)
2	5 (+1)	30 (-1)	5 (-1)
3	2 (-1)	60 (+1)	5 (-1)
4	5 (+1)	60 (+1)	5 (-1)
5	2 (-1)	30 (-1)	10 (+1)
6	5 (+1)	30 (-1)	10 (+1)
7	2 (-1)	60 (+1)	10 (+1)
8	5 (+1)	60 (+1)	10 (+1)
9	3,5 (C)	45 (C)	7 (C)
10	3,5 (C)	45 (C)	7 (C)
11	3,5 (C)	45 (C)	7 (C)
12	3,5 (C)	45 (C)	7 (C)

5.2 OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA

Os insumos utilizados para formulação da cerveja artesanal foram obtidos em mercados especializados em cervejas e o hibisco foi obtido em comércio local especializado em produtos naturais, ambos localizados em Recife – PE.

5.3 ELABORAÇÃO DA CERVEJA

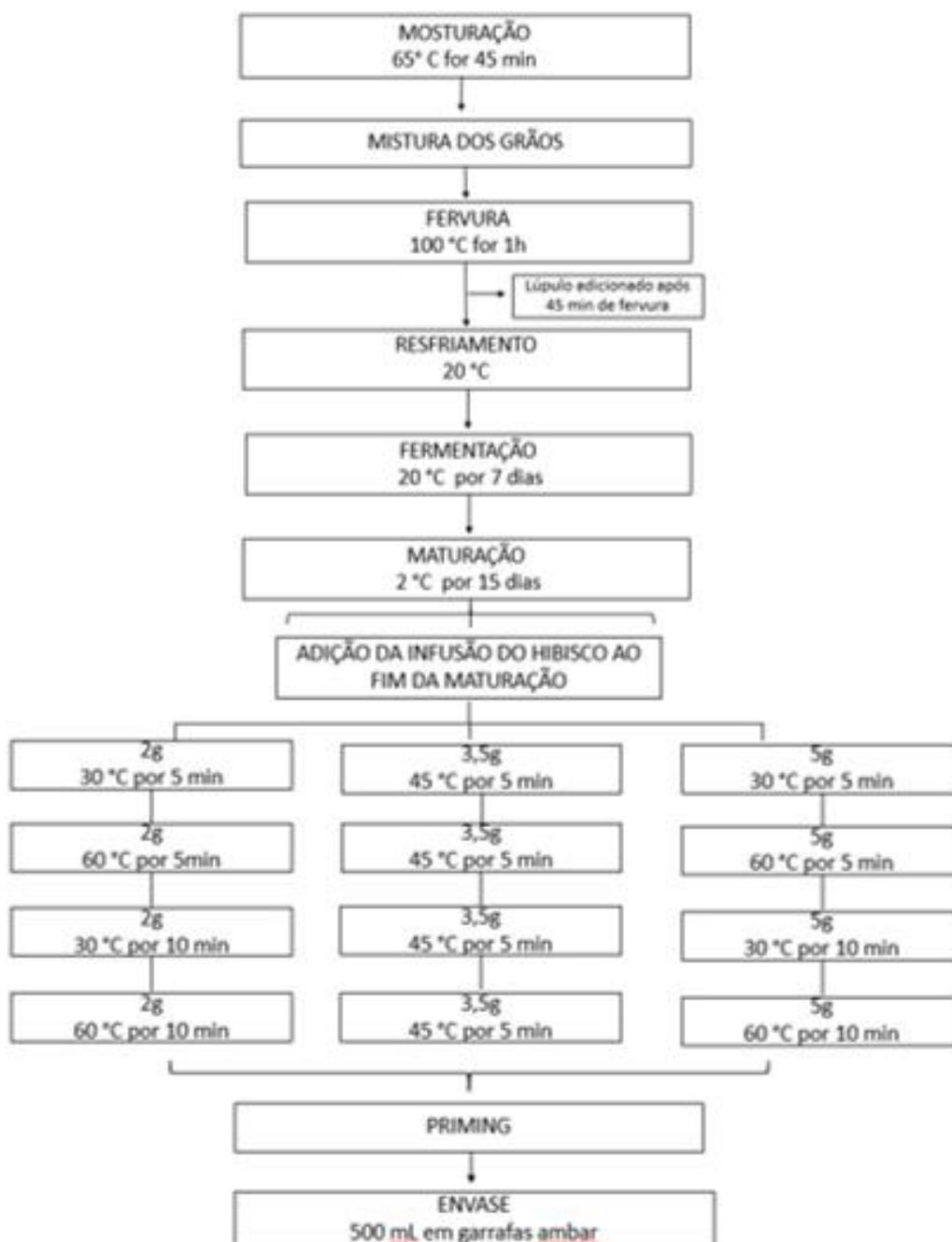
Foi elaborada uma cerveja do tipo *ale*, cuja formulação foi descrita no **Quadro 3**, desenvolvida no Departamento de Engenharia Química da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE, através de uma planta piloto, cujo principal objetivo seria a automatização do processo de elaboração da cerveja artesanal, de modo que o tempo de elaboração seja reduzindo, porém, sem perder a essência da produção artesanal. Foram produzidos 35 litros de cerveja para a realização dos experimentos.

Quadro 3 - Descrição da receita da formulação.

Itens	Quantidade
Água	60Kg
Malte Pilsner	7 Kg
Malte Caramel Amber	0,6 Kg
Malte Crystal Dark Muntons	0,6 Kg
Lúpulo (Northern Drewer)	0,2 kg
Levedura (S-04)	0,115 Kg

A planta elaborada consiste em três tanques: um de mostura, um de lavagem e outro de fervura. Os tanques são interligados por encanações. Possui um sistema de refrigeração, compostos por um trocador de calor de placas e um acumulador térmico feito a partir de um cooler com serpentina. Todo o processo é controlado por um aplicativo conectado ao computador, responsável pelo controle dos comandos, como temperatura, transferência de um tanque para outro, mistura e tempo de fervura. O processo produtivo foi descrito pela **Figura 3**.

Figura 3 - Fluxograma do processo produtivo da cerveja



O processo inicial para o preparo do mosto se deu na moagem dos grãos, processo responsável pela divisão dos grãos em partes menores e exposição do endosperma, o que facilitará o processo de quebra do amido. Em seguida, deu-se início a mosturação, também chamada de brassagem, procedimento no qual é realizada a adição dos grãos em água fervente, processo controlado pelas rampas de temperatura cujo objetivo é a hidrólise do amido. Após esse processo, realizou-se a recirculação e a transferência para o tanque de fervura. Após

transferência, atingiu-se a temperatura de 100 °C para início da fervura e adição do lúpulo. Terminada a fervura, realizou-se o *Whirlpool* (força centrípeta a qual o líquido é submetido) e iniciou-se o resfriamento do mostro e passagem para o fermentador.

O resfriamento foi realizado pelo trocador de placas de calor. Após o resfriamento, o mosto foi transferido para o fermentador, onde foi adicionado as leveduras e em seguida mantido sob resfriamento adequado para favorecer a formação do gás carbônico e do etanol. A cerveja permaneceu no fermentador durante 7 dias a uma temperatura de 20 °C.

Após a fermentação, realizou-se o processo de maturação. A cerveja permaneceu maturando durante o período de 15 dias a uma temperatura de 2 °C. A adição do hibisco (2g, 3,5 g e 5g) foi realizada a partir da infusão dos seus cálices nos tempos e temperaturas descritas acima, e adicionados no fim do processo de maturação. Cerca de 25mL da infusão foi adicionada as cervejas.

Após esse período, foi realizado o envase e a carbonatação a partir do *priming*, que consiste em adição de açúcares fermentáveis para produção de CO₂ que serão produzidos pelas leveduras restantes.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA

5.4.1. Graduação alcoólica

O teor alcoólico foi realizado a partir da densidade relativa a 20 °C conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Os valores de densidade relativa foram convertidos em teor alcoólico utilizando a Tabela de Conversão da densidade relativa a 20°C/20°C em porcentagem de álcool do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

5.4.2 Determinação de pH

A determinação do pH, foi realizada através do método potenciométrico em medidor de pH (DM 21 Digimed®) calibrado com soluções tampão (Merk®) pH 4,0 e 7,0.

5.4.3 Determinação de Cor

A determinação da cor foi realizada segundo a EBC (European Brewing Convention, 2005), realizada por espectrofotometria. As amostras foram filtradas em papel filtro e em seguida, realizada a leitura da absorbância a 430 nm, com o uso de uma cubeta de vidro de 10

mm. O resultado da cor foi expresso usando a seguinte equação 1 descrita abaixo, onde A é a absorvância a 430 nm:

$$\text{Equação 1: } \text{Cor} = A_{430\text{nm}} \times 25$$

5.4.4 Determinação de Amargor

A determinação do amargor (IBU – *International Bitterness Units*) das cervejas foi realizado segundo metodologia descrita pela *American Society of Brewing Chemists* (ASBC, 1996). As amostas filtradas e descarbonatadas foram previamente acidificadas pela adição de 0,5 mL de HCl 6,0 mols L⁻¹ misturadas com 20,0 mL de iso-octano. Em seguida procedeu-se medição espectrofotométrica no comprimento de onda de 275 nm em cubeta de quartzo de 10 mm. O resultado do amargor foi calculado pela seguinte equação 2:

$$\text{Equação 2: } \text{IBU} = A_{275 \text{ nm}} \times 50$$

5.4.5 Extrato Real

A determinação do extrato real por este método foi baseada na pesagem do resíduo seco de um certo volume de amostra submetido à evaporação, conforme metodologia descrita por Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para a quantificação do extrato real foi mensurada 20mL de cerveja em triplicada colocadas em cápsulas de porcelana. Posteriormente, as capsulas foram levadas ao banho-maria até a secagem na sequência foram levadas à estufa a 100 °C por 1 hora, resfriadas à temperatura ambiente e pesadas em balança analítica com quatro casas de precisão.

O extrato real representa todos os sólidos que fazem parte da composição da cerveja. O extrato real aumenta à medida que aumenta a taxa de evaporação da água. O extrato real também está relacionado com o corpo da cerveja pois indica a quantidade de açúcares, dextrinas e proteínas restantes na cerveja depois da fermentação. A maioria das cervejas ricas em extrato real são mais encorpadas que as demais.

5.4.6 Extrato primitivo ou original

Para determinação do extrato primitivo foi realizada a metodologia descrita pelo ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC, 2006), no qual foi

obtido por meio de cálculo envolvendo os valores de teor alcoólico e extrato real segundo a equação de Balling, conforme descrita abaixo. O extrato primitivo refere-se à quantidade de extrato inicialmente presente no mosto, ou como traz a legislação brasileira, IN MAPA n°54 de 05/11/2001, “o extrato primitivo é a quantidade de substancias (extrato) do mosto que deu origem à cerveja e se expressa em porcentagem (%) em peso”. A quantidade de extrato primitivo é uma das formas de classificação da cerveja, podendo ser classificada em cerveja leve, cerveja, cerveja extra e cerveja forte dependendo do valor de extrato original (**Quadro 4**).

$$\text{Equação 3: Ext. primitivo} = \frac{[(P \times 2,066) + Er] \times 100}{[100 + (P \times 1,066)]}$$

P= % de álcool em peso; Er= % de extrato real

Quadro 4 - Classificação da cerveja segundo o extrato primitivo

Tipo de cerveja	Valor mínimo (%m/m)	Valor máximo (%m/m)
Cerveja leve	Menor ou igual a 5	Menor que 10,5
Cerveja	Maior ou igual a 10,5	Menor que 12,0
Cerveja Extra	Maior ou igual a 12,0	Menor que 14,0
Cerveja Forte	Maior que 14,0	

Fonte: IN MAPA n 54 de 05 de novembro de 2001.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1 Método DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH será avaliada pela atividade eliminatória de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazila). A avaliação da atividade antioxidante da cerveja pelo método de seqüestro de radicais livres foi mensurada por meio de doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (VERAS et al., 2020; CHEUNG et al., 2003). Um análogo da vitamina E (Trolox®) foi usado como padrão e a curva de calibração foi preparada. Os dados foram expressos como equivalente ao Trolox (TE) da capacidade antioxidante por litro de cerveja (mmol TE/L).

5.5.2 Método ABTS

O método do ABTS (2,2-azino-bis (ethylbenzo-thiazoline6-sulfonic acid) diammonium salt) está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006)

A atividade antioxidante das cervejas foi determinada usando o teste ABTS% + (VERAS et al., 2019; RE et al., 1999). Amostras de 0,06 mL das infusões e da cerveja foram misturadas com 3 mL de solução ABTS% + com absorção medida de 0,700 a um comprimento de onda de 734 nm. Após 6 minutos, a absorvância das amostras foi medida. Os dados foram expressos em mmol Trolox equivalente à capacidade antioxidante por litro de cerveja (mmol TE/L).

5.5.3 Poder Redutor

A determinação foi realizada conforme descrito por BERKER, 2010. Resumidamente, 1 ml de amostra de cerveja diluída foi misturada com tampão fosfato (2,5 ml, 0,2 mol / l, pH 6,6) e K₃Fe (CN) 6 (2,5 ml, 1%). A mistura foi incubada a 50 ° C por 30 min. Uma porção (2,5 ml) de ácido tricloroacético (10%) foi adicionado à mistura, que foi depois centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 min. A camada superior da solução (2,5 ml) foi misturado com água desionizada (2,5 ml) e FeCl₃ (0,5 ml, 0,1%), e a absorvância foi medida a 700 nm. A medição foi comparada com uma linha de calibração de solução de ácido ascórbico (AA), e os resultados finais foram expressos em milimoles de equivalentes ácido ascórbico (AAE) por litro de cerveja (mmol AAE/L).

5.5.4 Determinação do Conteúdo Total de Polifenóis (CTP)

A quantificação dos compostos fenólicos totais das infusões e das cervejas foram realizadas usando o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), conforme metodologia descrita por LI et al. (2008). Ácido gálico-GA (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000 µg/mL foi utilizado para obter a curva de calibração padrão (em triplicata). Os valores de absorvância das amostras da cerveja foram convertidos em equivalente de ácido gálico (GAE) mg/L.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises executadas no presente estudo foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos na caracterização da cerveja foram submetidos ao teste t de *student* para comparação entre as formulações teste e controle. Esses resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. No planejamento fatorial, os resultados foram expressos através de gráficos de superfície e diagramas de pareto. As análises estatísticas foram realizadas no software *Graphpad Prism 7.0*, os gráficos obtidos no software *Statistica 10.0*. O nível de significância foi mantido em $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA

A caracterização da cerveja foi realizada a partir dos parâmetros de teor alcoólico, amargor (IBU), cor (EBC), extrato real, extrato primitivo e pH, conforme descrito na Legislação Brasileira (BRASIL, 2009), e foram apresentados na **Tabela 1**.

Com relação ao teor de álcool, as cervejas apresentaram um percentual de 4,7%. O teor alcoólico encontrado foi semelhante aos valores encontrados por SANTOS (2016) em formulação de cerveja adicionada de erva-mate. Nos estudos realizados por DUCRUET et al. (2017) e ZAPATA et al. (2019), que desenvolveram cerveja com adição de frutas em cervejas do tipo ale, obtiveram valores de teor alcoólico superiores a 5,2%. A presença do hibisco nas formulações parece não influenciar na concentração de álcool, uma vez que não foi adicionada durante o processo de fermentação, sendo este realizado pelas leveduras, que como produto final, são responsáveis pela produção de álcool (DRAGONE et al, 2010). A adição de novos ingredientes ricos em carboidratos fermentáveis, como frutas ou outros adjuntos, durante essa fase do processo, influenciam no aumento progressivo do teor alcoólico com a acréscimo do adjunto devido ao aumento de substrato a ser utilizado pelas leveduras, e conseqüentemente, contribuindo para o aumento do teor alcoólico (BRUNELLI, 2013).

Quanto ao amargor (IBU), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações, apresentando a variação de 14,7 a 24,9 IBU, sendo a cerveja padrão a que obteve maior unidades de amargor. Quanto as demais formulações, observa-se grande variação entre as unidades. COLLIN et al, (1994), verificaram que valores de amargor preferidos sensorialmente em cervejas encontraram-se entre 17,5 a 25 BU. O estudo realizado por Silva & Faria (2008) avaliou o amargor em cervejas americana e brasileira incluindo os tipos *lager*, *pale ale*, microcervejarias e *lager pilsener* encontraram valores de IBU entre 12 a 27, semelhante ao encontrado no presente estudo. O amargor da cerveja está atribuído aos alfa-ácidos presentes no lúpulo, e além dessa característica, possui capacidade antibacteriana o que contribui para a estabilidade da cerveja e afeta suas características sensoriais como sabor e aroma (DRESEL et al., 2016).

Tabela 1 - Caracterização das cervejas segundo os parâmetros de amargor (IBU), cor (EBC), extrato real, extrato primitivo e pH comparados com o padrão

ENSAIO	IBU	EBC	EXTRATO REAL	EXTRATO PRIMITIVO	pH
PADRÃO	24,3 ± 0,00 ^a	67,2 ± 0,03 ^a	4,0 ± 0,25 ^a	12,9 ± 0,25 ^a	4,1 ± 0,01 ^a
1	20,7 ± 0,05 ^b	65,0 ± 0,10 ^b	5,5 ± 1,00 ^a	14,3 ± 0,95 ^a	4,2 ± 0,01 ^b
2	19,2 ± 0,65 ^b	70,5 ± 0,08 ^b	3,7 ± 0,25 ^a	12,6 ± 0,25 ^a	3,6 ± 0,24 ^a
3	14,7 ± 1,7 ^b	70,0 ± 0,08 ^b	3,4 ± 0,05 ^a	12,4 ± 0,00 ^a	3,9 ± 0,03 ^b
4	16,8 ± 1,3 ^b	63,8 ± 0,05 ^b	4,8 ± 0,50 ^a	13,7 ± 0,50 ^a	3,8 ± 0,07 ^a
5	14,6 ± 0,8 ^b	61,3 ± 0,08 ^b	4,4 ± 0,15 ^a	13,3 ± 0,15 ^a	4,0 ± 0,00 ^b
6	21,1 ± 0,03 ^b	61,4 ± 0,08 ^b	3,1 ± 0,05 ^a	12,1 ± 0,05 ^a	3,9 ± 0,01 ^b
7	17,5 ± 1,45 ^b	63,8 ± 0,06 ^b	3,1 ± 0,15 ^a	12,1 ± 0,15 ^a	4,0 ± 0,01 ^a
8	19,3 ± 0,04 ^b	59,9 ± 0,63 ^b	3,9 ± 0,05 ^a	12,9 ± 0,05 ^a	4,1 ± 0,01 ^a
9	20,9 ± 0,30 ^b	59,9 ± 0,03 ^b	2,8 ± 0,10 ^a	11,8 ± 0,10 ^a	3,9 ± 0,00 ^b
10	15,6 ± 0,25 ^b	69,0 ± 0,10 ^b	4,6 ± 0,35 ^a	13,5 ± 0,35 ^a	4,1 ± 0,04 ^a
11	21,9 ± 1,00 ^a	64,7 ± 0,11 ^b	4,2 ± 0,00 ^a	13,1 ± 0,05 ^a	3,9 ± 0,05 ^a
12	19,4 ± 0,40 ^b	62,1 ± 0,00 ^b	3,0 ± 0,25 ^a	12,0 ± 0,25 ^a	4,0 ± 0,01 ^b

Dados expressos em média ± erro padrão. Ensaios 1-12 foram adicionados de hibisco extraído conforme descrito no Quadro 2. Padrão é a cerveja padrão sem adição de hibisco. Valores de média com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os parâmetros de extrato real e extrato primitivo não apresentaram diferenças significativas entre as amostras comparadas com a formulação padrão. Os valores de extrato real referem-se à quantidade de sólidos presente na cerveja, indicando presença de açúcares, dextrinas e proteínas restantes da fermentação. Já o extrato primitivo é tido como parâmetro de classificação da cerveja, proposto pela Legislação Brasileira, a fim de caracterizar a cerveja de acordo com o percentual de extrato presente no mosto, classificando as bebidas como Cerveja Leve, Cerveja, Cerveja Extra e Cerveja Forte (BRASIL, 2009), conforme descrito no **Quadro 3**. As formulações elaboradas foram classificadas como Cerveja Extra, segundo a Legislação.

A avaliação da cor foi realizada a partir do EBC, escala utilizada como parâmetro de coloração das cervejas. Foi encontrada diferença significativa entre todas as amostras comparadas ao padrão ($p < 0,05$). Ao classificar as cervejas baseado no EBC, conforme descrito pela legislação brasileira (BRASIL, 2009), as cervejas são caracterizadas como Cerveja Escura devido aos valores do EBC serem maiores que 20.

Quanto ao pH, houve diferença significativa entre as formulações. Todas as cervejas obtiveram valores abaixo de 4,5, garantindo a segurança microbiológica, pois segundo Rosa (2015), a suscetibilidade biológica da cerveja aumenta especialmente quando o pH é superior a 4,5. Com relação a estabilidade das antocianinas, estudos mostram que variações no pH resultam em modificação da estrutura das antocianinas (GRADINARU et al., 2003; GRAJEDA-IGLESIAS et al., 2016). Alterações no equilíbrio e na forma estrutural podem comprometer a capacidade antioxidante das antocianinas (BROUILLARD et al, 1989).

6.2 RESPOSTA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSTOS FENÓLICOS DA CERVEJA A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Os resultados do planejamento 2^3 foram apresentados na **Tabela 2**. Observa-se que quanto maior a concentração de hibisco presente na infusão e quanto maior a temperatura e tempo de extração, maiores são os valores de atividade antioxidante.

Os valores da Contagem Total de Polifenóis (CTP) encontrados no presente estudo variaram de $389,66 \pm 0,19$ a $749,41 \pm 0,26$. O estudo de DUCRUET et al (2017), no qual goji berrys foram adicionadas no processamento da cerveja, apresentaram valores de CTP variando de 335 mg GAE/L na cerveja padrão, até 623 mg GAE/L na formulação em que os o goji berry foi adicionado no início da fervura do mosto. As publicações apresentam grande variação de valores de compostos fenólicos em diferentes tipos de cerveja. PIAZZON et al (2010) avaliou

o conteúdo de fenólicos em diferentes estilos de cerveja e observou que houve aumento tanto nos compostos fenólicos quanto na atividade antioxidante na seguinte sequência dos estilos: cervejas sem álcool < lager < pilsner < trigo < ale < abbey < bock beer, concluindo que cervejas mais escuras apresentam maior conteúdo fenólico e maior capacidade antioxidante do que as cervejas sem álcool e cervejas clara.

A atividade antioxidante com relação ao % de inibição do radical DPPH variam de $2,22 \pm 0,05$ a $5,73 \pm 0,18$ mmol TE/L, apresentando aumento proporcional entre as variáveis, ou seja, quanto maiores a concentração do hibisco, tempo e temperatura, mais elevado o valor de DPPH. No ABTS, os valores foram semelhantes ao DPPH variando de $2,28 \pm 0,11$ a $7,80 \pm 0,11$ mmol TE/L.

Os resultados encontrados no presente estudo foram superiores aos avaliados em cervejas comerciais do tipo *Lager* chinesas e exportadas (0.16 to 2.23 mmol/L TE) (ZHAO et al., 2010, 2013) e em cervejas do tipo *Ale Belgas* (0.64–1.08) (TAFULO et al., 2010). Já no estudo de KAWA-RYGIELSKA (2019), onde foram adicionados extrato do suco de frutas semelhantes a cerejas em cervejas do tipo ale durante o período da primeira e segunda fermentação, apresentaram valores de atividade antioxidante semelhante aos encontrados na presente pesquisa. Os resultados acima sugerem que a matéria-prima e o processo de fabricação de cerveja podem ter influências significativas na atividade de eliminação de radicais DPPH e também possuem impacto na eliminação de cátions ABTS da cerveja.

A formulação 8 apresentou valor superior de atividade antioxidante ($7,80 \pm 0,11$ mmol TE/L), quando comparado ao estudo citado por DUCRUET et al. (2017), indicando que a presença do hibisco favoreceu o aumento da atividade antioxidante. A adição de *gojiberry* em cerveja do tipo ale obtiveram valores semelhantes de ABTS, variando de 2,26 a 3,87 (DUCRUET et al, 2017).

Tabela 2 - Resposta das variáveis independentes com as atividades antioxidantes e polifenóis totais

Ensaio	Independentes			Dependente 1	Dependente 2	Dependente 3	Dependente 4
	Concentração de Hibisco*	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	DPPH (mM Trolox)	ABTS (mM Trolox/L)	PR (mg AA eq./g dry extract)	Polifenóis (GAE mg/L)
1	2 (-1)	30 (-1)	5 (-1)	2.28 ± 0.01	2.28 ± 0.11	787.75 ± 0.13	389.66 ± 0.19
2	5 (+1)	30 (-1)	5 (-1)	3.48 ± 0.13	2.60 ± 0.03	918.38 ± 0.26	481.19 ± 0.12
3	2 (-1)	60 (+1)	5 (-1)	2.55 ± 0.14	3.04 ± 0.02	832.52 ± 0.16	437.80 ± 0.18
4	5 (+1)	60 (+1)	5 (-1)	4.09 ± 0.21	2.71 ± 0.01	988.29 ± 0.21	497.37 ± 0.15
5	2 (-1)	30 (-1)	10 (+1)	2.91 ± 0.17	3.21 ± 0.13	915.68 ± 0.31	502.37 ± 0.23
6	5 (+1)	30 (-1)	10 (+1)	4.62 ± 0.11	4.11 ± 0.12	1060.54 ± 0.26	574.07 ± 0.45
7	2 (-1)	60 (+1)	10 (+1)	2.22 ± 0.05	1.39 ± 0.14	1097.66 ± 0.28	672.29 ± 0.10
8	5 (+1)	60 (+1)	10 (+1)	5.73 ± 0.18	7.80 ± 0.11	1374.23 ± 0.27	749.41 ± 0.26
9	3,5 (C)	45 (C)	7,5 (C)	2.65 ± 0.02	2.92 ± 0.02	883.24 ± 0.14	467.05 ± 0.28
10	3,5 (C)	45 (C)	7,5 (C)	2.68 ± 0.01	2.94 ± 0.01	884.00 ± 0.13	468.21 ± 0.19
11	3,5 (C)	45 (C)	7,5 (C)	2.64 ± 0.13	2.92 ± 0.03	883.80 ± 0.12	466,16 ± 0.12
12	3,5 (C)	45 (C)	7,5 (C)	2.63 ± 0.14	2.93 ± 0.02	882.98 ± 0.26	466,80 ± 0.18

*Concentração de Hibisco (g/100mL; DPPH - (2,2-difenil-1-picrihidrazila); ABTS - (2,2 Azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonite); PR – Poder redutor. Valores dos resultados expresso em média ± DP.

Na **Figura 4**, a maior influência sobre a atividade antioxidante realizada pelo método do DPPH decorreu da concentração de hibisco, seguido pelo tempo de extração ($P < 0,05$). As combinações entre concentração de hibisco e tempo de extração; concentração de hibisco e T (°C) de extração também se tornam relevantes quando avaliados pelo método do DPPH. A temperatura de extração apresentou menor influência quando comparada com as demais variáveis isoladas ou combinadas. Com relação a combinação entre os fatores de tempo e temperatura de extração, o gráfico nos mostra influência negativa relacionada com a atividade antioxidante.

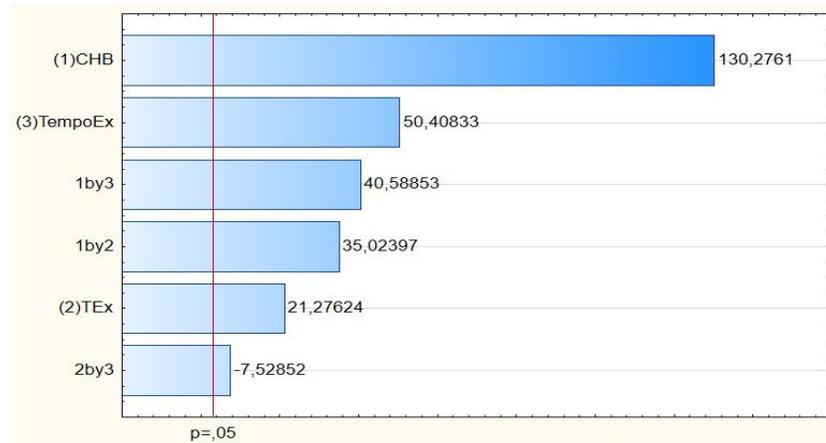
Ao relacionarmos as variáveis independentes (concentração de hibisco, tempo e temperatura de extração) com a atividade antioxidante determinada pelo método ABTS, observamos que os valores encontrados foram consistentes aos do DPPH. O método do DPPH consiste na capacidade de eliminar os radicais DPPH podem doar hidrogênios para radicais livres. Já o ABTS, atua na eliminação de cátions pelo radical ABTS, que também reflete na capacidade de doação de hidrogênio. Portanto, cervejas que possuem maior eliminação dos radicais DPPH e maior atividade de eliminação de cátions ABTS, possuem maior estabilidade do sabor da cerveja uma vez que impedem a formação de compostos relacionados a oxidação lipídica (VANDERHAEGEN et al., 2006). O diagrama mostra que as variáveis propostas apresentaram relevância na atividade antioxidante, indicando forte interação entre tais variáveis pelo método utilizado.

O desempenho das variáveis relacionadas com a atividade antioxidante realizada pelo método PR mostrou um comportamento semelhante ao ABTS. Contudo, diferente das demais análises, o fator tempo de extração teve maior relevância do que a concentração de hibisco e a temperatura de extração. O poder redutor está associado à atividade antioxidante e pode servir como um reflexo significativo da atividade antioxidante. Compostos com o poder redutor indica que eles poderiam reduzir os intermediários oxidados dos processos de peroxidação lipídica e atuar como antioxidantes primários ou secundários (LUGASI; HÓVÁRI, 2003).

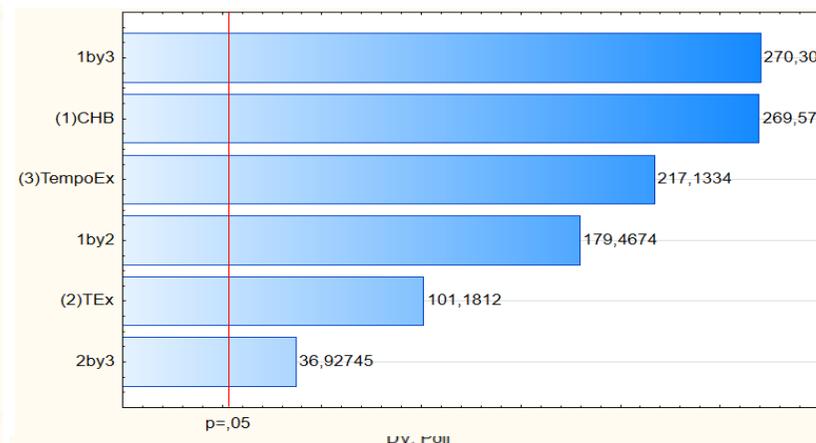
Com relação a CTP, o tempo e a temperatura foram as variáveis que mais apresentaram influência nos polifenóis, seguido pela concentração de hibisco. Já a combinação de tempo e temperatura de extração, juntamente com a concentração de hibisco e tempo de extração, apresentaram influência negativa no processo.

Figura 4 - Diagrama de pareto expressando a relevância das variáveis independentes (Concentração de hibisco, temperatura de extração e tempo de extração) com a atividade antioxidante através do método DPPH, ABTS e PR, e da contagem total de polifenóis (CTP), respectivamente

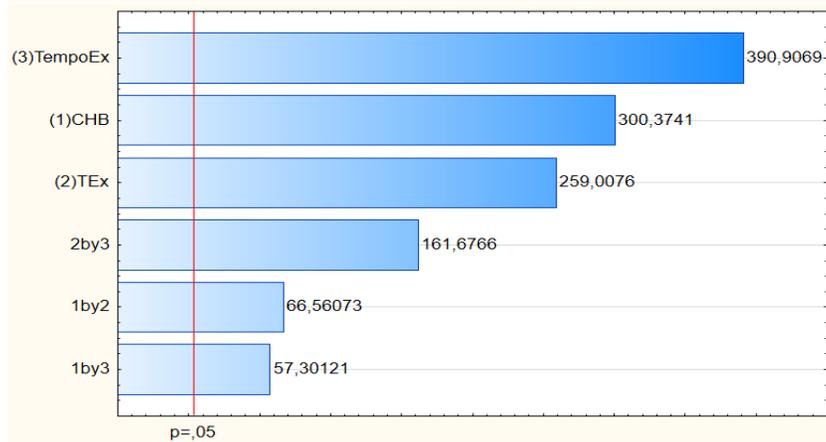
(A)



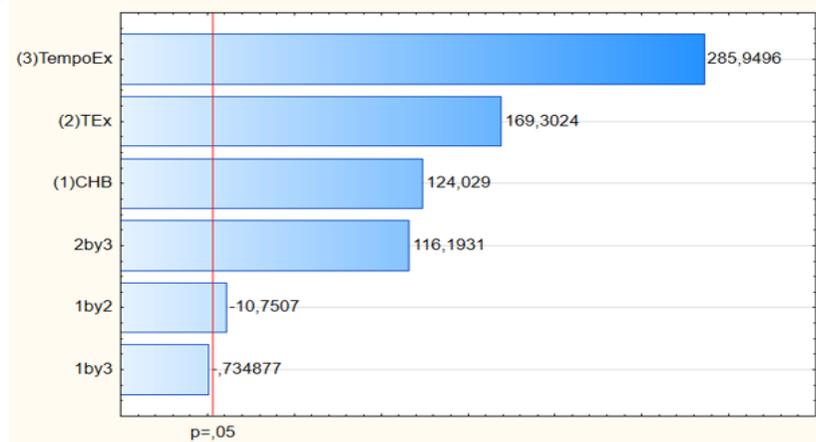
(B)



(C)



(D)



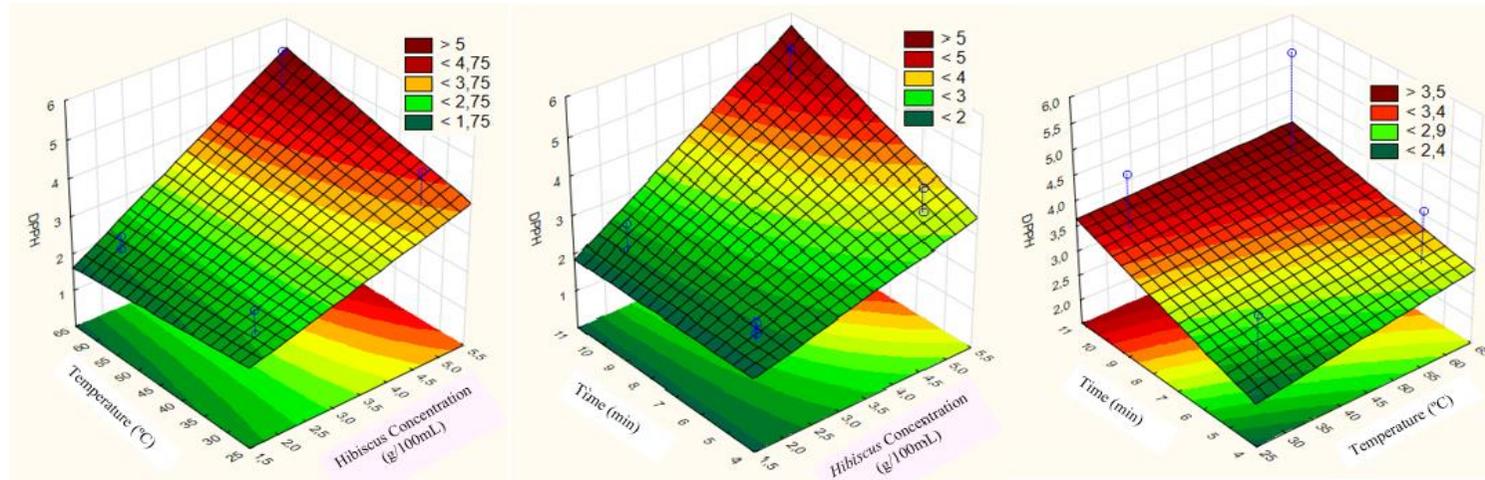
Avaliando o comportamento dos gráficos de superfície (**Figura 5.**) com as variáveis independentes relacionadas as atividades antioxidantes, as figuras apresentam comportamentos semelhantes entre si. Nos gráficos que relacionam as atividades antioxidante com o tempo e a temperatura de extração mostram que os valores utilizados no estudo apresentam estabilidade nos resultados encontrados, uma vez que chegando em sua temperatura e tempo ótimo de extração, aumento dos padrões utilizados não influenciaria no aumento da atividade antioxidante.

A adição de hibisco em concentrações superiores aos utilizados no presente estudo através da infusão dos cálices do hibisco pode influenciar com o aumento da atividade antioxidante e de compostos fenólicos presente nas cervejas, porém podem contribuir negativamente no aspecto sensorial. Alguns fatores como o tipo de solvente utilizado, tamanho das partículas e tempo e temperatura e de extração podem influenciar no rendimento dos constituintes químicos (ZHANG et al., 2006; CISSÉ et al., 2012).

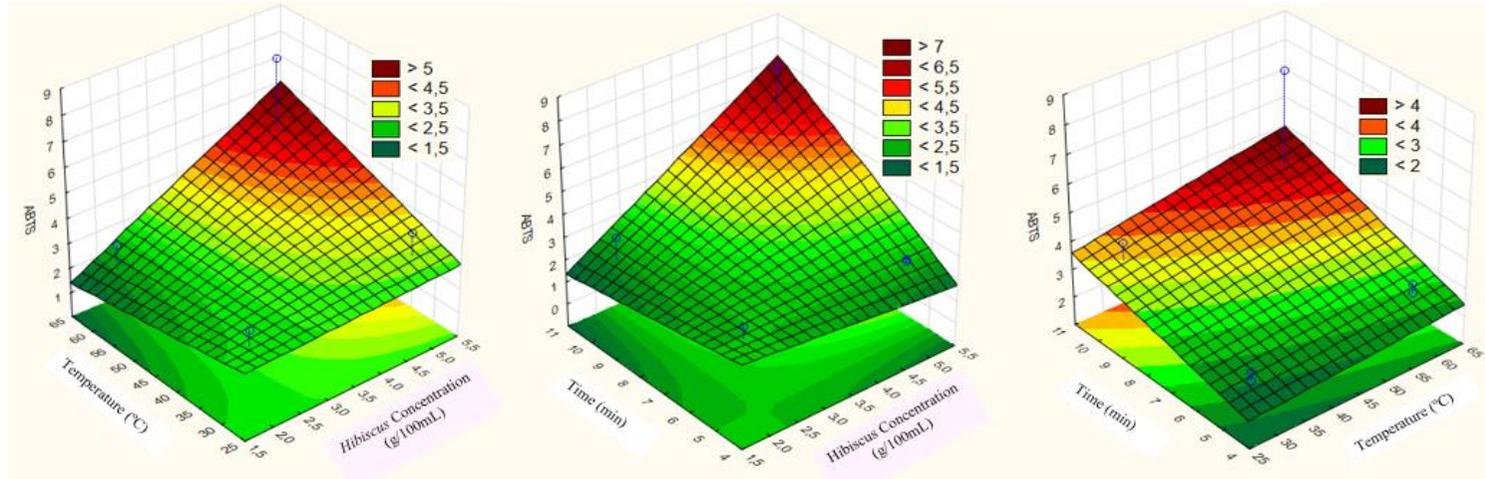
Longos períodos de extração e temperatura mais elevadas, tendem a aumentar a possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos e degradação de antocianinas (NACZK; SHAHIDI, 2004). O estudo realizado por MACIEL et al, 2018, no qual foi realizado um planejamento fatorial 2^2 para avaliar a melhor condição de extração de compostos em *Hibisco sabdariffa* L. mostraram que a temperatura de 60 °C por 20 minutos foram as melhores condições de extração do maior teor de antocianinas.

Figura - Gráficos de superfície de resposta do efeito da atividade antioxidante pelo método DPPH (A), ABTS (B) e Poder Redutor (RP) (C) e Contagem de Total de Polifenóis (CTP) relacionando a Concentração dos Cálices de Hibisco e Temperatura de Extração; ao Tempo de Extração e Quantidade de Hibisco; e Tempo e Temperaturas de Extração, respectivamente

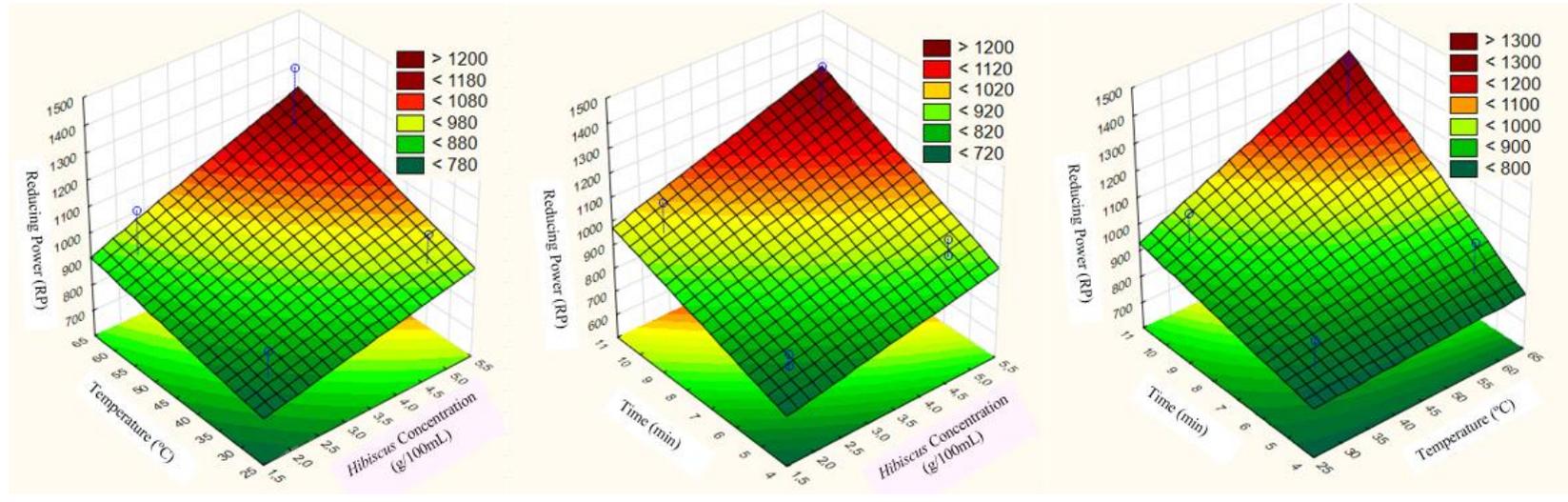
(A)



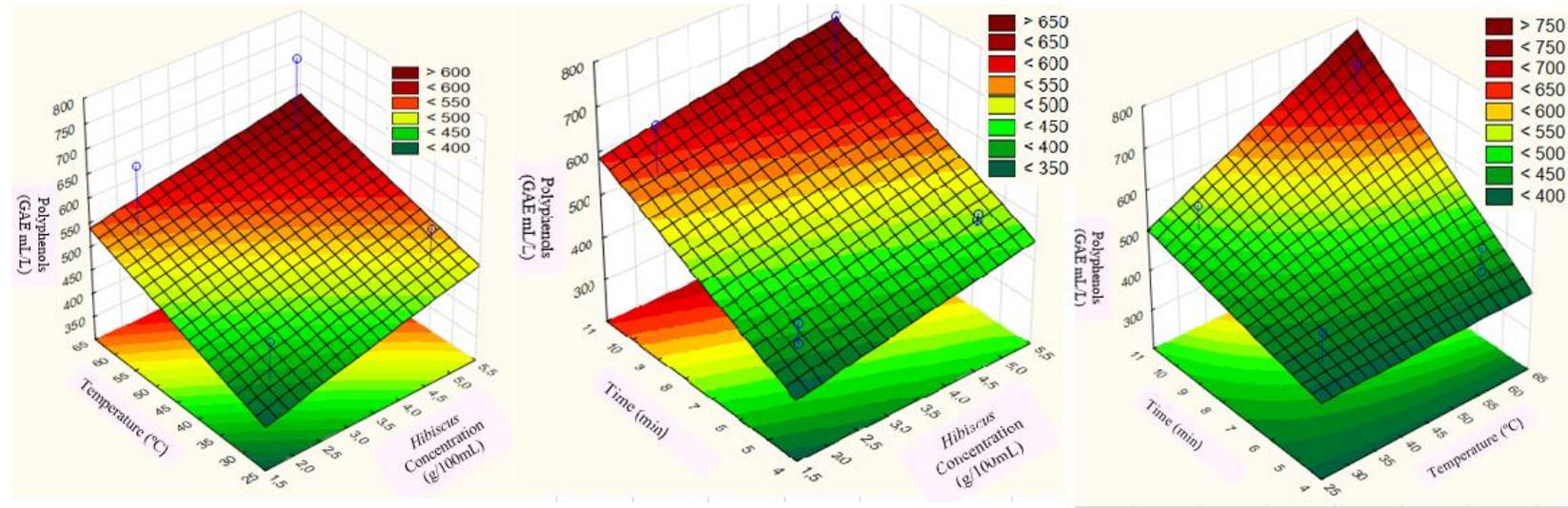
(B)



(C)



(D)



7 CONCLUSÃO

Obteve-se uma cerveja classificada como Cerveja tipo extra, de coloração escura. Conclui-se que a adição de hibisco através da infusão dos seus cálices nas formulações de cervejas aumentou a atividade antioxidante e do conteúdo de fenólicos no produto. Foi visto que a maior concentração de hibisco sugerida no estudo, junto com os maiores tempos de extração e maior temperatura, parece favorecer a resposta nos métodos de atividade antioxidante testados e do conteúdo de fenólicos.

Os resultados obtidos mostram que a adição da infusão do hibisco potencializou a capacidade antioxidante das cervejas, podendo ser utilizado pela indústria como alternativa de produto a ser utilizado na elaboração de produtos alimentícios que apresentam potencial fenólico, antioxidante e características físico-químicas relevantes.

7.1 PERSPECTIVAS

Sugere-se novos estudos com valores superiores aos testados para avaliar sua influência nos aspectos antioxidante e a presença de fenólicos. Além da realização de análise sensorial para verificar a aceitação do produto por consumidores. As condições testadas no presente estudo podem ser utilizadas pela indústria alimentícia para o desenvolvimento de alimentos com potencial funcional utilizando o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* L.

REFERÊNCIAS

- ABRACERVA. Associação Brasileira das Cervejarias Artesanais. Acesso em: <<http://abracerva.com.br/com-91-novos-registros-no-1o-semester-mercado-das-artesanais-avanca-no-brasil-e-ja-tem-610-cervejarias/>>
- AL-HASHIMI, Alaa G. Antioxidant and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa L. extracts. *African Journal of Food Science*, v. 6, n. 21, p. 506-511, 2012.
- ALI, Badreldin H.; WABEL, Naser Al; BLUNDEN, Gerald. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, v. 19, n. 5, p. 369-375, 2005.
- ALMAGUER, Cynthia et al. Humulus lupulus—a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- ALMEIDA e SILVA, J. B. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: EdgardBlücher, 2005. Cap. 15, p. 347-382.
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (ASBC). Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists. Madison: ASBC, 1958. 209p
- analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 935.20) Gaithersburg: A.O.A.C., 2005, Revision 1, 2006, chapter 27. p. 4.
- ANDRES, Victor et al. Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 53, n. 1, p. 71-80, 2014.
- AQUARONE, Eugênio. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. Edgard Blucher, 1983.
- AQUILANI, Barbara et al. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food quality and preference**, v. 41, p. 214-224, 2015.
- ARAUJO et al. Comportamentos do consumidor de cervejas especiais. *Revista científica da escola de Gestão e Negócios*, v.5 n.1, 2016
- ASBC. Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists (8th Revised 508 ed.). Minnesota: The Technical Committee and the Editorial Committee of the ASBC, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of
- BARATA, Ana Maria et al. Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 8-11, 2016.
- BARHÉ, T. Andzi; TCHOUYA, GR Feuya. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from Hibiscus Sabdariffa L., Glycine max L. Merr., yellow tea

and red wine through reaction with DPPH free radicals. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.

BERKER, Kadriye Işıl et al. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 154-168, 2010.

BLEIER, B. et al. Craft Beer Production. University of Pennsylvania. Filadélfia: editor, 2013. 565 p.

BORRÁS-LINARES, I. et al. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.

BRASIL. Decreto Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Poder executivo, Brasília, DF, 04 de jun de 2009. Seção 3, pag 10

BRASIL. Decreto Nº 9.902, de 8 de julho de 2019. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Poder executivo, Brasília, DF, 04 de jun de 2009. Seção 3, pag 10

BRESCIANI, Letizia et al. (Poly) phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 2, p. 11-19, 2015.

BRIGIDO, Riveli Vieira; NETTO, Michael Scarpa. Produção de cerveja. **UFSC. Santa Catarina**, 2006.

BROUILLARD, R. et al. The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 111, n. 7, p. 2604-2610, 1989.

BRUNELLI, Luciana Trevisan; MANSANO, Alexandre Rodrigues; VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 19-27, 2014

BRUNELLI, Luciana Trevisan; VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. ANÁLISE ENERGÉTICA DE CERVEJA ELABORADA COM MEL. *Energia na Agricultura*, v. 28, n. 2, p. 122-128, 2013

BUSCH, J. More Beer. 2015. Disponível em: <<https://www.morebeer.com/articles/advancedmasching>>.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. v. 10, p. 178-182, 2002.

CHEUNG, L.M. et al. Antioxidant activity and total polyphenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.* 81: 249–255, 2003.

CISSÉ, Mady et al. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, v. 109, n. 1, p. 16-21, 2012.

COLLIN, S.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J. P. Relationships between the chemical composition and sensory evaluation of lager beers. *Food Quality and Preference*, v. 5, n. 1-2, p. 145-149, 1994.

COLLIN, Sonia et al. Polyphenols and beer quality. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, KG, Mérillon, J.-M., Eds, p. 2333-2359, 2013.

CORTEZ, Regina et al. Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 1, p. 180-198, 2017.

CRUZ, Iara; PINHEIRO, L. Juliana; AMORIM, Suélen M.; KUGLIN, Vanessa B. **Produção de cerveja**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. .

DA-COSTA-ROCHA, Inês et al. *Hibiscus sabdariffa* L.–A phytochemical and pharmacological review. **Food chemistry**, v. 165, p. 424-443, 2014.

D'AVILA, Roseane Farias et al. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, 2012.

DE KEUKELEIRE, D.; . Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica nova*, 23(1), 108-112, 2000.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G (Org.). *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. São Paulo: Edgard Blücher, 2010.

DRESEL, Michael et al. The bitter chemodiversity of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 64, n. 41, p. 7789-7799, 2016.

DUCRUET, Julien et al. Amber ale beer enriched with goji berries–The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food chemistry*, v. 226, p. 109-118, 2017.

EGGENSPERGER, H.; WILKER, M. Hibiscus-Extrakt: Ein hautverträglicher Wirkstoffkomplex aus AHA's und polysacchariden. Teil 1. *Parfümerie und Kosmetik*, v. 77, n. 9, p. 522-523, 1996.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. *Analytica – EBC*. London: Elsevier, 1963. Method 8.5. Revised Oct. 2005.

FERREIRA, Rubens Hermógenes et al. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

FRIMPONG, Grace et al. Potential of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces as coloring agent in three pediatric oral pharmaceutical formulations. 2014.

FUMI, Maria Daria et al. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 4-5, p. 568-573, 2011.

GADOTTI, Gizele Ingrid et al. ANÁLISE ECONÔMICA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO PARA AMPLIAÇÃO DE UMA MICROCERVEJARIA EM CANELAS. *Revista Técnico-Científica*, v. 1, n. 3, 2015.

GASTONI FILHO, W. V. Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia. **São Paulo-SP. Editora Blucher, volume1**, 2010.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, v. 41, n. 13, p. 1941-1954, 2005.

GRADINARU, G. et al. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, v. 83, n. 3, p. 423-436, 2003.

GRAJEDA-IGLESIAS, Claudia et al. Isolation and characterization of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Journal of natural products*, v. 79, n. 7, p. 1709-1718, 2016.

GRANATO, Daniel et al. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 3, p. 563-571, 2011.

HIGGINBOTHAM, Kristen L. et al. Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, v. 40, p. 274-277, 2014.

HIRUNPANICH, Vilasinee et al. Antioxidant Effects of Aqueous Extracts from Dried Calyx of *Hibiscus sabdariffa* L INN.(Roselle) in Vitro Using Rat Low-Density Lipoprotein (LDL). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 3, p. 481-484, 2005.

HOUGH, James Shanks et al. **Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer**. Springer, 1971.

IFIE, Idolo et al. The effect of ageing temperature on the physicochemical properties, phytochemical profile and α -glucosidase inhibition of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) wine. **Food chemistry**, v. 267, p. 263-270, 2018.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tíglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020. 2008

KAWA-RYGIELSKA, Joanna et al. Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food chemistry*, v. 281, p. 147-153, 2019

KHOO, Hock Eng et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

LEI, Hongjie; ZHAO, Haifeng; ZHAO, Mouming. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast. **Biochemical engineering journal**, v. 77, p. 1-6, 2013.

LEITAO, Céline et al. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of cereal science*, v. 55, n. 3, p. 318-322, 2012.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. *Brewing*. 2. ed. Nova Iorque: Publishers, Kluwer Academic/Plenum, v. 1, p.375, 2002.

LI, H.B. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 385–390, 2008.

LIU, Suwen et al. Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. **Food chemistry**, v. 212, p. 87-95, 2016.

LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidante properties of beer. *Acta Alimentaria*, v. 32, n.2, p. 181-192, 2003.

LUGASI, Andrea; HÓVÁRI, Judit. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Food/Nahrung*, v. 47, n. 2, p. 79-86, 2003.

MACIEL, Laércio Galvão et al. Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 113, p. 187-197, 2018.

MARTINS, Natália et al. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1-15, 2016.

MARTINS, Pâmella Karen Bernardelli; FERREIRA, Vanessa Schramm. **Produção de cerveja artesanal com gengibre (*Zingiber officinalis*)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MATOS, Ricardo Augusto Grasel et al. *Cerveja: panorama do mercado, produção artesanal, e avaliação de aceitação e preferência*. 2011.

MORADO, Ronaldo. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2011.

MÜLLER, Bernd M.; FRANZ, Gerhard. Chemical structure and biological activity of polysaccharides from Hibiscus sabdariffa. *Planta medica*, v. 58, n. 01, p. 60-67, 1992.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

OBOUAYEBA, Abba P. et al. Hepatoprotective and antioxidant activities of Hibiscus sabdariffa petal extracts in Wistar rats. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology* 2014b, v. 3, n. 5, p. 774-780, 2014.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. **Minas Gerais, Programa de pós-graduação, UFMG**, 2011.

PAPAZIAN, C. **The Homebrewer's Companion**. New York: Harper Collins Publishers Inc, 2 ed. 2014.

PEDRO, Alessandra Cristina; GRANATO, Daniel; ROSSO, Neiva Deliberali. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food chemistry*, v. 191, p. 12-20, 2016.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food research international*, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PIAZZON, Alessandro; FORTE, Monica; NARDINI, Mirella. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 19, p. 10677-10683, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237, 1999.

REINOLD, M. R. O mercado cervejeiro brasileiro atual potencial de crescimento. *Revista Industrial de Bebidas: Fc Santos*, 2011. Ano 10. Nº57 2011

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. *Química. nova escola*, v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.

SACHS, L. G. Cerveja. Paraná, FFALM, 2001. 24p.

SANTOS, Clarissa Obem dos et al. Elaboração de cerveja com adição de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): qualidade físico-química e sensorial. 2016.

SANTOS, Tiago Mesquita dos. **Elaboração de cerveja caseira (fermentado alcoólico de lúpulo) e avaliação de alguns parâmetros físico-químicos**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotechnologia industrial**. São Paulo, v. 3, 2001.

SILVA, Paulo Henrique Alves da; FARIA, Fernanda Carolina de. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 902-906, 2008.

SINDI, Heba A.; MARSHALL, Lisa J.; MORGAN, Michael RA. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of Hibiscus sabdariffa. *Food chemistry*, v. 164, p. 23-29, 2014.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Health-related aspects of beer: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 2, p. 350-373, 2012.

TAFULO, Paula Alexandra Ribeiro et al. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food research international*, v. 43, n. 6, p. 1702-1709, 2010.

TOZETTO, Luciano Moro et al. **Produção e caracterização de cerveja artesanal adicionada de gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

TSCHÁ, Anna Regina et al. Craft beer: cultura, identidade e tendências de consumo na cidade do Recife. 2018.

VAGIRI, Michael; JENSEN, Martin. Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. **Food chemistry**, v. 217, p. 409-417, 2017.

VANDERHAEGEN, Bart et al. The chemistry of beer aging—a critical review. *Food Chemistry*, v. 95, n. 3, p. 357-381, 2006.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni et al. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. **São Paulo: Edgard Blucher**, 2005.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. Coordenador. *Bebidas Não alcoólicas: Ciência e Tecnologia*. São Paulo: Blucher, 2010.

VENTURINI, W.; CEREDA, M. *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2008.

VERAS, Bruno Oliveira et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 2020.

VERAS, Bruno Oliveira et al. *Algrizea Minor Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil*. *Natural product research*, p. 1-5, 2019.

VIROLI, Sérgio Luis Melo et al. *Produção e análise de cerveja artesanal a base de milho*. 2015.

ZAPATA, Pedro J. et al. Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *LWT*, v. 103, p. 139-146, 2019.

ZHANG, Min et al. Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa*, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera* and *Murraya koenigii* leaves. *J Med Plants Res*, v. 5, n. 30, p. 6672-80, 2011.

ZHANG, Ming-Wei et al. Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice. *Agricultural Sciences in China*, v. 5, n. 6, p. 431-440, 2006.

ZHAO, Haifeng et al. Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 4, p. 910-917, 2013.

ZHAO, Haifeng et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010.