

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**ELIZIANE CAPPELIN**

**CERVEJA LIGHT DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO ENRIQUECIDA COM EXTRATO  
DE FOLHAS DE OLIVEIRA: TÉCNICA DE COLD MASHING ASSOCIADA À  
FERMENTAÇÃO INTERROMPIDA**

**PATO BRANCO**

**2023**

**ELIZIANE CAPPELIN**

**CERVEJA LIGHT DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO ENRIQUECIDA COM EXTRATO  
DE FOLHAS DE OLIVEIRA: TÉCNICA DE COLD MASHING ASSOCIADA À  
FERMENTAÇÃO INTERROMPIDA**

**Low-alcohol light beer enriched with olive leaves extract: cold mashing technique associated with  
interrupted fermentation**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

**PATO BRANCO**

**2023**



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. 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



ELIZIANE CAPPELIN

**CERVEJA LIGHT DE BAIXO TEOR ALCÓOLICO ENRIQUECIDA COM EXTRATO DE FOLHAS DE OLIVEIRA: TÉCNICA DE COLD MASHING ASSOCIADA À FERMENTAÇÃO INTERROMPIDA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 21 de Dezembro de 2023

Dr. Mario Antonio Alves Da Cunha, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Orlives Martinez Castro, Doutorado - Cervejaria Insana

Dra. Patricia Appelt, Doutorado - Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 21/12/2023.

## RESUMO

A procura por cervejas diferenciadas com características peculiares tem se intensificado entre os consumidores de cerveja no Brasil, o que cria um nicho de mercado significativo. Neste contexto, uma cerveja artesanal light de baixo teor alcoólico enriquecida com extrato de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) foi desenvolvida no presente trabalho. A técnica de *cold mashing* foi empregada na etapa de mosturação, a qual associada à fermentação interrompida permitiu a obtenção de uma bebida de baixo teor alcoólico ( $\cong 1,3\%$ ). Na fase de maturação foram adicionadas diferentes concentrações do extrato comercial de folhas de oliveira (0,5, 1,0 e 2,0%, m/v), e uma amostra foi mantida como controle (sem adição do extrato). As amostras foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos de qualidade, conteúdo de fenólicos e polifenólicos, compostos bioativos, potencial antioxidante e qualidade microbiológica. As dimensões amargor (19,0 a 23,2 IBU) e cor (9 – 17 EBC) segundo o Beer Judge Certification Program (BJCP) em concordância com o estilo *American Blond Ale*. A adição do extrato enriqueceu o teor de fenólicos totais (171,09 mg GAE/mL para 437,4 mg GAE/mL) e polifenólicos (221,4 mg/L para 729,0 mg/L). Os ácidos fenólicos cumárico, ferúlico e cinâmico foram detectados em quantidades apreciáveis nas cervejas. A oleuropeína foi o principal composto da bebida e do extrato vegetal. A capacidade de eliminar radicais ABTS (28,4%), DPPH (449,1%) e redução de íons férricos (120,5%) aumentou com a adição de 2% de extrato. O extrato de *Olea europaea* L. promoveu o enriquecimento das amostras de cervejas de baixo teor alcoólico com compostos bioativos e potencial antioxidante. Os resultados obtidos indicam o potencial uso do extrato de *Olea europaea* L. em outras bebidas e produtos alimentícios como antioxidante natural.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Amargor. Brassagem a frio. Fermentação interrompida. Fenólicos. Extrato vegetal.

## ABSTRACT

The search for differentiated beers with peculiar characteristics has intensified among beer consumers in Brazil, creating a significant market niche. In this context, a light craft beer with low alcohol content enriched with olive leaf extract (*Olea europaea* L.) was developed in this study. The cold mashing technique was employed in the mashing stage, which, coupled with intermittent fermentation, allowed for producing a low-alcohol beverage (approximately 1.3%). In the maturation stage, different concentrations of commercial olive leaf extract (0.5, 1.0, and 2.0%, w/v) were added, and one sample was kept as a control (without extract addition). The samples were characterized for physicochemical quality parameters, phenolic and polyphenolic content, bioactive compounds, antioxidant potential, and microbiological quality. The values for the bitterness (19.0 to 23.2 IBU) and color (9 – 17 EBC) dimensions indicated that the beers fall under the American Blond Ale style according to the Beer Judge Certification Program (BJCP). Adding the extract enriched the total phenolic content (171.09 mg GAE/mL to 437.4 mg GAE/mL) and polyphenolic content (221.4 mg/L to 729.0 mg/L). The phenolic acids coumaric, ferulic, and cinnamic were detected in appreciable amounts in the beers. Oleuropein was the main compound in both the beverage and the plant extract. The ability to scavenge ABTS radicals (28.4%), DPPH (449.1%), and ferric ion reduction (120.5%) increased with the addition of 2% extract. *Olea europaea* L. extract promoted the enrichment of low-alcohol beer samples with bioactive compounds and antioxidant potential. The results indicate the potential use of *Olea europaea* L. extract as a natural antioxidant in other beverages and food products.

**Keywords:** Antioxidant. Bitterness. Cold mashing. Interrupted fermentation. Phenolics. Plant extract.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dados de pesquisa internacional no Brasil de venda de cerveja .....	17
Figura 2 - Estilos de cervejas dos grupos Ale e Lager .....	19
Figura 3 - Variedades da coloração do malte (intensificação da tostagem da esquerda para a direita) .....	22
Figura 4 - Lúpulo in natura (A) e pellet (B) .....	24
Figura 5 - Imagens da árvore e dos frutos da oliveira .....	26
Figura 6 - Fluxograma de fabricação da cerveja .....	29
Figura 7 - Técnica do cold mashing (brassagem a frio) .....	30
Figura 8 - Tanque de fermentação de 25L .....	32
Figura 9 - Tanques de maturação com adição do extrato .....	33
Figura 10 - Cerveja pronta e envasada .....	34
Figura 11 - Laudo das análises físico-química e microbiológicas das amostras .....	79
Figura 12 - Curvas de calibração das análises de antioxidantes e fenólicos totais ...	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais enzimas envolvidas na brassagem, substratos, produtos e faixas ótimas de atuação.....	23
Tabela 2 - Ingredientes para fabricação da cerveja <i>American Blonde Ale</i> .....	28
Tabela 3 - Conversão da densidade relativa a 20°C/20 °C em porcentagem de extrato .....	75
Tabela 4 - Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%...	78

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Íons da água e a influência sensorial na cerveja.....	23
--	----



## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Equação química dos produtos formados na fermentação alcoólica .....	24
Equação 2 - Cor da cerveja por SRM .....	35
Equação 3 - Ácidos voláteis.....	36
Equação 4 - Ácidos totais .....	36
Equação 5 – Etanol, % (vv).....	37
Equação 6 - Calorias (kcal) /100 ml de cerveja.....	38
Equação 7 - Amargor (IBU).....	38
Equação 8 - Extrato real.....	39
Equação 9 – Extrato primitivo .....	39
Equação 10 – Polifenólicos totais .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABV	Álcool por volume
ASBC	American Society of Brewing Chemists (Sociedade Americana Cerveja Química)
BJCP	Beer Judge Certification Program (Programa de Certificação de Juiz de Cerveja)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EBC	Convenção de Cervejeiros da Europa
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante Redutor Férrico)
IBU	International Bitterness Unit (Unidade Internacional de Amargor)
LD	Limit Dextrinase (Limitar Dextrinase)
LDL	low-Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)
NMP	Número Mais Provável
SEM	Método de Referência Padrão

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1 HISTÓRICO .....	15
<b>3.2 CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA E INSUMOS NA PRODUÇÃO CERVEJEIRA</b> .....	<b>18</b>
3.2.1 Água.....	20
3.2.2 Malte de cevada.....	22
3.2.3 Lúpulo – <i>Humulus lupulus</i> .....	23
3.2.4 Leveduras .....	24
<b>3.3 OLIVEIRA: <i>OLEA EUROPAEA L.</i></b> .....	<b>25</b>
<b>3.4 CERVEJA E OS SEUS BENEFÍCIOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 EXTRATO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA .....	28
<b>4.2 ELABORAÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL</b> .....	<b>28</b>
4.2.1 Mosturação e/ou Brassagem.....	29
4.2.2 Fervura.....	31
4.2.3 Resfriamento.....	31
4.2.4 Fermentação.....	31
4.2.5 Adição do extrato das folhas da oliveira.....	32
4.2.6 Maturação .....	33
4.2.7 Carbonatação, envase e pasteurização .....	33
<b>4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA</b> .....	<b>34</b>
4.3.1 Determinação da cor (EBC).....	35
4.3.2 pH final.....	35
4.3.3 Determinação de acidez volátil .....	36
4.3.4 Teor alcoólico (% de álcool v/v).....	37
4.3.5 Teor calórico (Kcal/100mL).....	37
4.3.6 Densidade relativa. ....	38
4.3.7 Unidades de amargor (IBU).....	38
4.3.8 Extrato aparente, real e original.....	39
4.3.9 Estabilidade de espuma .....	40
<b>4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS POR CLAE</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5 FENÓLICOS TOTAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.6 POLIFENÓLICOS TOTAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.7 CAPTURA DE RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL)</b> .....	<b>42</b>

<b>4.8</b>	<b>POTENCIAL DE REMOÇÃO DO RADICAL ABTS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.9</b>	<b>CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (FRAP).....</b>	<b>43</b>
<b>4.10</b>	<b>ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
<b>6.1</b>	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>75</b>
<b>6.2</b>	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>78</b>
<b>6.3</b>	<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>79</b>
<b>6.4</b>	<b>ANEXO 4.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida obtida a partir da fermentação dos açúcares presentes em cereais maltados como cevada, milho e trigo, os quais são submetidos a aquecimento com adição de lúpulo e água potável, no processo de mosturação. O mosto é então submetido ao processo de fermentação alcoólica que por ação de leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, é produzida tal bebida milenar.

O consumo e produção de cerveja vem crescendo gradativamente ao longo do tempo e atualmente representa aproximadamente 87% do volume de bebidas alcoólicas consumidas no país. Em paralelo com outros países, o Brasil ocupa o 3º lugar no ranking de produção de cervejas no mundo, sendo superado apenas pela China e Estados Unidos.

Atualmente a procura por cervejas diferenciadas e com características próprias tem se intensificado entre os apreciadores da bebida. Esta demanda tem criado um nicho de mercado e proporcionado espaço para as chamadas microcervejarias, onde geralmente são produzidas cervejas artesanais com estilos, aromas e sabores diferenciados.

Entre os diferentes tipos e estilos começa a surgir um potencial mercado que é o das cervejas com reduzido conteúdo de álcool, popularmente conhecida como cerveja de baixo teor alcoólico e também as cervejas sem álcool. A produção destes tipos de cervejas representa um atrativo nicho de mercado, o qual tem sido estimulado por fatores como a intensificação de restrições legais, em especial relacionado à direção sob efeito de álcool, bem como a busca dos consumidores por uma vida mais saudável.

Com a ampliação do mercado cervejeiro e a possibilidade da inserção das microcervejarias, a produção de cervejas com adições de frutas e extratos vegetais que possam trazer algum benefício a saúde tem sido cada vez mais estudada. Pesquisas reportam potenciais benefícios do consumo de cervejas não alcoólicas por grupos específicos de pessoas, como por exemplo atletas de resistência, que precisam substituir os líquidos e eletrólitos perdidos pela transpiração (RIESENHUBER, BOEHM, *et al.*, 2006).

A bebida pode ser uma boa opção para o pré e pós treino, pois além de ser isotônica é rica em vitaminas e minerais, além de conter carboidratos que

contribuem para o fornecimento da energia necessária nesse momento. Em atletas de alto rendimento e que praticam treinos mais intensos, há uma diminuição não só dos eletrólitos, mas também da atividade do sistema imunológico tornando-os mais suscetíveis a processos inflamatórios (MURPHY, DAVIS, *et al.*, 2010, SIMPSON, KUNZ, *et al.*, 2015, VOLMAN, RAMAKERS, *et al.*, 2008).

Similarmente, o extrato das folhas da *Olea europaea* L. (oliveira) apresenta inúmeras propriedades farmacológicas (ACAR-TEK, N., AĞAGÜNDÜZ, 2020), incluindo atividade antioxidante e antiinflamatória, cardioprotetora, anticarcinogênica e hepatoprotetora. Os compostos fenólicos presentes no óleo agem como antioxidante evitando a oxidação do colesterol LDL (*low-density lipoprotein*).

O foco principal é o enriquecimento da bebida com compostos polifenólicos bioativos com propriedades antioxidantes, antimicrobiana, cardioprotetora (OSORIO-PAZ *et al.*, 2019). Deste modo, o presente estudo tem por objetivo desenvolver e caracterizar uma cerveja artesanal de baixo teor alcoólico, de estilo *American Blonde Ale*, incorporada com extrato comercial de folhas de oliveira, utilizando a técnica de Cold Mashing associada à fermentação interrompida no processo cervejeiro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar uma Cerveja light de baixo teor alcoólico enriquecida com extrato de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando a técnica de cold mashing associada à fermentação interrompida no processo cervejeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o extrato comercial de *Olea europaea* L. em relação aos conteúdos de fenólicos totais, polifenólicos totais, atividade antioxidante (protocolos ABTS, DPPH, FRAP) e compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Produzir uma cerveja com baixo teor alcoólico do tipo *American Blonde Ale*, usando cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* e empregando a técnica de *cold mashing* e fermentação interrompida no processo cervejeiro.
- Incorporar o extrato comercial polifenólico de *Olea europaea* L. na cerveja desenvolvida em concentrações de 0,5%, 1% e 2% (m/v), visando o enriquecimento em compostos polifenólicos e antioxidantes.
- Caracterizar a cerveja quanto aos principais parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade: Cor (EBC), acidez volátil, pH final, teor alcoólico, unidades de amargor (IBU), calorías, retenção de espuma, extrato aparente, extrato real e primitivo, e análise microbiológica para coliformes totais.
- Identificar na cerveja e no extrato de oliveira a quantidade de fenólicos totais, polifenólicos totais, potencial antioxidante (protocolos ABTS, DPPH, FRAP), compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Histórico

O invento da cerveja tem sido discutido como um dos possíveis motivadores para o desenvolvimento da cultura humana no período conhecido como “Revolução Neolítica”, quando os primeiros animais foram domesticados e os primeiros campos de cereais surgiram. Neste período os grãos eram processados e uma das principais formas de conservação e consumo era a fermentação dos grãos e produção da cerveja (DAMEROW, 2012).

Como mencionado, o surgimento da bebida está diretamente ligado ao domínio das culturas de cereais, principalmente da cevada e do trigo, que estão diretamente relacionados com a transição do homem nômade, para a vida em comunidades sedentárias e com relações sociais mais complexas, demonstradas através da estruturação das cidades (STANDAGE, 2005).

Apesar da utilização de diferentes ingredientes, a bebida que hoje é chamada de cerveja, teve origem em diferentes partes do mundo. Povos como os escandinavos, asiáticos, africanos e latino americanos desenvolviam suas bebidas com o uso de cereais, as quais podem então ser consideradas também como cervejas. Um exemplo é a bebida cauim, que é obtida pela fermentação da mandioca ou do milho por algumas reservas indígenas da América do Sul, inclusive entre os tupinambás. Outro exemplo é a chicha, produzida por povos andinos também a partir do milho, sendo esta além de um alimento, um elemento constituinte de sua cultura como povo (ALBUQUERQUE, 2016, MORADO, 2009, POHL-VALERO, 2020).

Na transição do período medieval para a idade moderna, acompanhando a rápida urbanização, surgimento dos grandes centros urbanos e industriais, bem como da atividade burguesa, a produção passou aos poucos do âmbito privado para o público. Com o rápido crescimento populacional e o aumento da demanda nas grandes cidades, se tornou propício à especialização e aprimoramento das técnicas de produção de cerveja, estabelecendo arranjos produtivos e sendo possível abastecer as localidades durante todo o ano (GIORGI; JÚNIOR, 2016).



Entre os séculos XV e XVI o consumo de cerveja se espalhou definitivamente por toda a Europa. O consumo per capita da bebida em algumas regiões foi impressionante. Segundo dados de Unger (2007) na cidade de Antuérpia, na Bélgica, o consumo médio por habitante (17000 habitantes) foi de 369 litros no ano de 1531. Em Hamburgo, com 50000 habitantes na época, seguindo a mesma tendência, um consumo médio de 400 litros por pessoa no ano de 1550 foi registrado. As mesmas médias de consumo foram encontradas em Lubeck, a qual somava 25000 habitantes.

Entretanto, mesmo sendo uma indústria próspera e com alta demanda e potencial de crescimento, entrou em declínio no final do século XV. De acordo com Meussdoerffer (2009), a elevação do preço da cevada, a conseqüente diminuição da margem de lucro, a competição entre as cervejarias por mercados e o aumento considerável dos impostos sobre a bebida foram as principais razões do enfraquecimento da produção de cerveja na Europa no século em questão.

Depois de mais de um século de constante declínio da indústria cervejeira, o mercado da cerveja voltou a crescer no século XIX. Esse processo pode ser intimamente relacionado com o grande avanço industrial e técnico-científico observado no período, que inclui a descoberta da reação da fermentação alcoólica por Gay Lussac, a descoberta do processo de pasteurização por Louis Pasteur, o surgimento do método de secagem via aquecimento indireto dos grãos de Gabriel Sedlmayr II, que tornava o processo de produção dos maltes controlável; além do início da produção controlada através do isolamento de culturas puras de cevada. Esse crescimento também é atribuído as melhorias dos sistemas de refrigeração, a revolução nos transportes e a utilização de termômetros e microscópios no processo de produção cervejeira (GIORGI; JÚNIOR, 2016).

No Brasil a cerveja chegou por meio de colonizadores holandeses e da Índia ocidental, por volta dos anos de 1634 (século XVII) sendo produzidas por cozinheiros. As primeiras cervejarias surgiram em São Paulo, Rio de Janeiro e na região Sul na década de 1850. Em linha industrial a primeira cerveja começou a ser comercializada no Brasil na década de 70. Já na década de 80 foi possível observar a emergência de microcervejarias, proporcionando uma maior variabilidade de produtos e o crescimento do mercado artesanal. E em 1999 é criada a ambev – companhia de bebidas da américa, que tornou-se a maior produtora do mundo (BATISTA, 2014).

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas do mundo, obtendo notoriedade no mercado brasileiro desde que foi inserida no mesmo. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Cerveja, o país ocupa o terceiro lugar na produção anual de cerveja, com mais de 14 bilhões de litros produzidos (Figura 1) (CERVBRASIL, 2021).

**Figura 1- Dados de pesquisa internacional no Brasil de venda de cerveja**



**Fonte: SINDICERV (2022)**

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV, 2021), houve um aumento de 30% no consumo de cervejas do tipo não alcoólicas em 2021, chegando a um total de 257 milhões de litros anual, evidenciando um mercado em emergência e abrindo espaço para a produção de novas variedades de bebidas não alcoólicas.

Esse rápido crescimento do mercado de cervejas não alcoólicas, leva em conta vários fatores, sendo uma possibilidade, o surgimento de novas regras e legislações tratando da direção sob efeito de álcool, mais conhecida por “Lei Seca”; preocupações com a saúde e até mesmo motivos religiosos. No entanto, boa parte das cervejas não alcoólicas disponíveis são associadas à um perfil de sabor desagradável que não agrada o consumidor. Por esse motivo, é fundamental que as bebidas não alcoólicas proporcionem as mesmas sensações palatáveis equivalentes às suas semelhantes com álcool, buscando abranger um mercado ainda maior (CATARINO; MENDES, 2011).

### 3.2 CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA E INSUMOS NA PRODUÇÃO CERVEJEIRA

A cerveja pode ser classificada de diferentes maneiras, uma delas é por sua forma de fermentação com seus diferentes tipos de leveduras utilizadas e temperatura de crescimento microbiano. Dentro dessas especificações temos as cervejas do tipo *Ale* e *Lager*, as quais representam a maior parte da produção, e em menor quantidade as produzidas com fermentação mista e fermentação espontânea (LARROQUE, CARRAU, *et al.*, 2020).

As cervejas do tipo *Ale* são consideradas cervejas de alta fermentação, toleram temperaturas entre 15°C e 25°C e utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que ao final da fermentação tende a subir na superfície do tanque fermentador. Já as que são *Lager* apresentam temperatura de fermentação mais baixas de 8°C a 12°C, e podem utilizar outras linhagens do gênero *Saccharomyces*. Na fermentação *Lager* a levedura flocula e se deposita no fundo do tanque fermentativo (OSORIO-PAZ *et al.*, 2019).

A fermentação mista é uma técnica utilizada para produzir cervejas ácidas chamada de *kettle sour*, onde é utilizada uma levedura e bactéria láctica, sendo essas *lactobacillus ssp.*. A *Catharina Sour*, é um estilo de cerveja Brasileira produzida por meio da fermentação láctea e alcoólica, apresentando um sabor acético com características refrescantes (BARRETO, 2022).

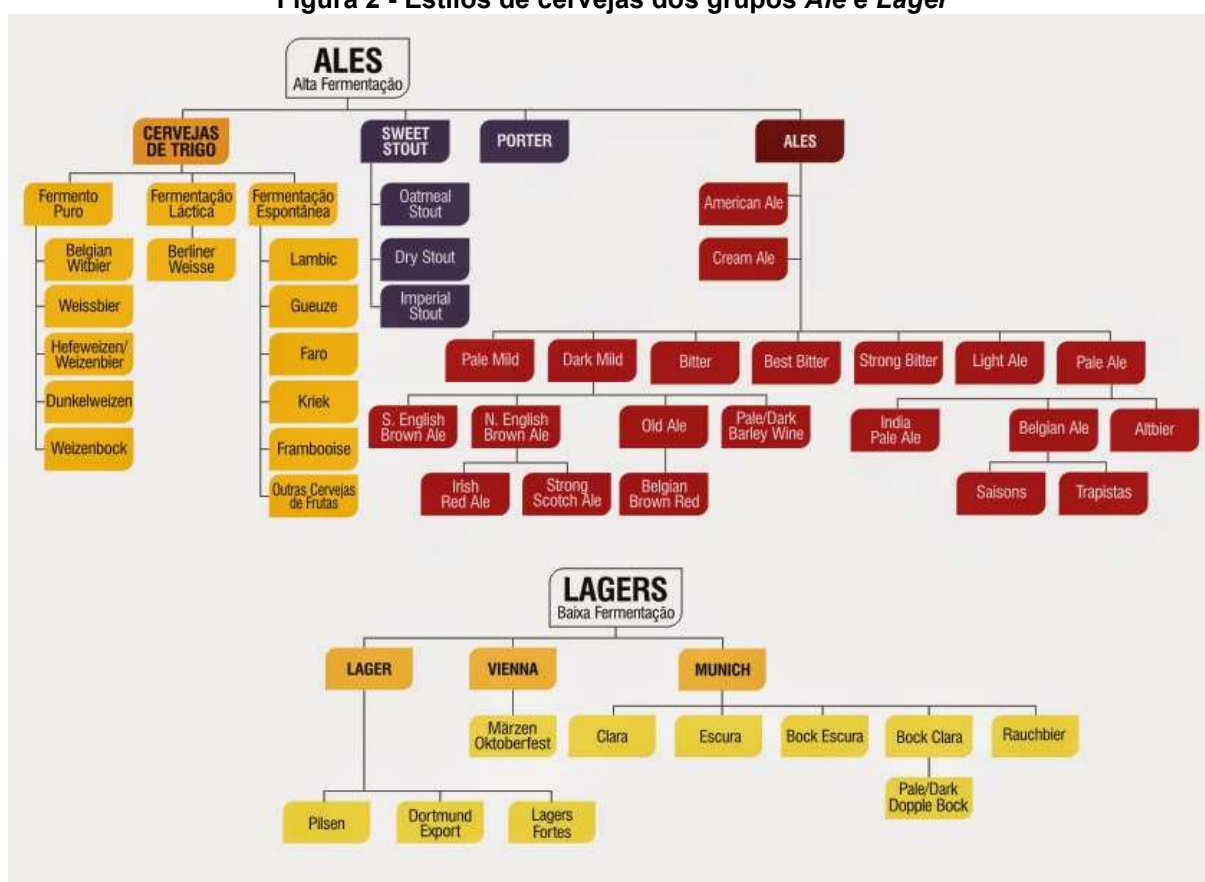
Já a fermentação espontânea é aquela que não ocorre a adição de levedura. As cervejas são colocadas em barris de madeira abertos e ocorre o contato natural com leveduras (*Brettanomyces ssp.*) e bactérias selvagens presentes no ambiente de fermentação, na madeira ou na matéria-prima. O processo comumente ocorre em temperatura ambiente, sendo mais produzidas em países frios. Neste contexto, a cerveja conhecida como *Lambic* de origem Belga, é uma das formas de produção mais antigas da história cervejeira (ADAMENKO; KAWA-RYGIELSKA, *et al.*, 2019, PORT, 2017).

Dentro dos dois grandes grupos das *Ales* e *Lagers*, existem vários estilos de cervejas (Figura 2), que por meio de uma combinação variada de seus ingredientes (lúpulo, malte, água, leveduras e adjuntos) proporcionam aparência, sabor e aromas diferenciados que os tornam únicos. Cada estilo deve seguir seu padrão e características específicas para estar dentro do estilo escolhido, baseado no guia de

estilos *Beer Judge Certification Program* (BJCP) (ALMEIDA, 2017, M. M. BONACCORS, 2018).

No grupo das cervejas *Ales* há a *American Blonde Ale*, uma cerveja Americana com uma característica refrescante de fácil consumo pelo seu sabor leve, tendo notas maltadas e leve toque de lúpulo e sendo muito indicada para consumir no calor. Apresenta uma aparência de cor amarela clara a dourada, com espuma branca de até médio volume, seu amargor fica entre baixo a média intensidade (COSTA, P. M. C. DA; ALMEIDA, *et al.*, 2019, M. M. BONACCORS, 2018).

Figura 2 - Estilos de cervejas dos grupos *Ale* e *Lager*



Fonte: <https://www.ocontadordecervejas.com.br/arquivos/uploads/2014/04/img-estacao-beerstylestree-1.jpg>

Segundo a Instrução Normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), a cerveja pode ser classificada também pelo seu conteúdo alcoólico, onde a cerveja sem álcool ou desalcooolizada, apresenta teores alcoólicos menores ou iguais a 0,5% em volume. As cervejas com teor alcoólico reduzido ou de baixo teor alcoólico, podem apresentar teores superiores a 0,5% mas não ultrapassar 2,0%, pois acima desta

porcentagem passa a ser denominada cerveja de alto teor alcoólico (BRASIL, 2019). As cervejas industriais e artesanias tem seu teor alcoólico variando de 4% a 6%, sendo obrigatório a descrição no rótulo das mesmas (SOUSA; FOGAÇA, 2019).

Com o aumento da procura pelos coconsumidores por cervejas não alcoólicas, a indústria começou a buscar novos métodos de produção voltados em melhorar o perfil aromático e gustativo dessas cervejas não alcoólicas, para satisfazer o consumidor e produzir uma cerveja o mais próximo das comercializadas alcoólicas (FRANCESCO; TURCHETTI, *et al.*, 2015). Para a produção de uma cerveja não alcoólica (concentração menor que 0,5% v/v) há várias métodos de produção como: Fermentação interrompida, processo de contato a frio (PCC), uso de leveduras especiais que não fermentem maltose e maltotriose como o caso da *Saccharomyces ludwigi*, evaporação a vácuo, evaporação em camada fina, osmose reversa e diálise (MONTANARI; MARCONI, *et al.*, 2009).

A técnica de *Cold Mashing* também chamada de brassagem a frio é outra alternativa para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico ou sem álcool. Este método tem como objetivo a extração do sabor e cor do malte, deixando a cerveja com mais corpo. A técnica também diminui a extração dos açúcares fermentescíveis sendo favorável para a produção de cerveja não alcoólica, podendo ser utiliza em conjunto com a fermentação interrompida para a produção da cerveja sem álcool (DALBERTO, DA ROSA, *et al.*, 2021)

### 3.2.1 Água

A água é de fundamental importância na produção da cerveja, representando 92 a 95% da bebida e interferindo diretamente na qualidade do produto, sendo importante a utilização de água potável, livre de qualquer contaminante (MEDEIROS *et al.*, 2018).

Na produção cervejeira há três tipos de água:

- Água cervejeira, é a que entra no processo de produção, como matéria prima.
- Água industrial, podendo ser utilizada clorada, para limpeza da indústria.
- Água de utilidades, são utilizadas em refrigeração, caldeiras dentre outras, apresentam baixo teor de cloro e cálcio deixando uma água mais leve (REBELLO, 2009).

A água apresenta vários íons dispersos em seu meio, que podem variar de acordo com sua fonte, deste modo é fundamental analisar a água cervejeira, dosar tais íons e se necessário realizar um balanceamento. Os íons presentes na água participam do processo fermentativo e da formação do sabor da cerveja, como pode ser observado na Quadro 1 (SALIMBENI; MENEGUETTI, *et al.*, 2016).

**Quadro 1 - Íons da água e a influência sensorial na cerveja**

Íon	Símbolo	Concentração ideal	Concentração alterada	Percepção sensorial (sabor)
Sódio	Na <sup>+</sup>	10 a 70 mg/L	150 a 200mg/L >200 mg/L	Realça corpo maltado; salgado;
Potássio	K <sup>+</sup>	300 a 500 mg/L	>500 mg/L	Salgado;
Magnésio	Mg <sup>2+</sup>	10 a 30 mg/L	>70mg/L	Amargo e azedo;
Cálcio	Ca <sup>2+</sup>	50 a 150 mg/L	>50mg/L	Azedo;
Hidrogênio	H <sup>+</sup>	pH 6,5 a 7,0 (depende da cerveja produzida);	pH <4 pH ≥3,7 pH >4 pH ≥4,4	Ácido, com tendencia para o amargor; metálico; torrado; sabão (básico);
Ferro	Fe <sup>3+</sup>	<0,05	≥ 0,05 mg/L	Metálico e adstringente;
Cloreto	Cl <sup>-</sup>	0 a 250 mg/L	>250mg/L	Salgado;
Sulfato	So <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	50 a 150mg/L (cervejas amargas); 150 a 350mg/L (cervejas muito amargas);	>400mg/L	Acentua amargor do lúpulo, adstringente e sulfuroso;

**Fonte: Salimbeni; Meneguetti; *et al.*, (2016)**

Além do controle da concentração dos íons, o ajuste do pH do mosto é de suma importância, sendo que a acidificação do meio facilita a quebra do amido pelas enzimas β-amilase e α-amilase, que pode ser realizada por meio da adição de ácido láctico 85% grau alimentício (BATISTA, 2014, FREIRE; LEMES, *et al.*, 2020, ROSA, AFONSO, 2015).

### 3.2.2 Malte de cevada

A cevada é o cereal preferido para produção do malte nas maltarias, uma vez que suas características físico-químicas e fisiológicas são ideais para o processo de maltagem e produção de cervejas e de bebidas destiladas. A cevada é submetida a um processo de controle de qualidade, e a qualidade de seus grãos define se ela vai ser destinada a maltagem ou para alimentação animal. A taxa de germinação, teor de proteína, teor de umidade, uniformidade dos grãos, níveis de grãos danificados, peso específico e quantidade de peneiras, são alguns dos requisitos de qualidade avaliados para os grãos serem aceitos para maltagem (TOROK *et al.*, 2020).

Na maltagem o cereal é submetido a um processo de germinação artificial e subsequente dessecação. O cereal é inicialmente coberto com água fria (5 a 18 °C) até seu intumescimento por aproximadamente 12 horas. Na sequência a água não absorvida é retirada e a temperatura é elevada para 30°C, o que induz a germinação dos grãos. A germinação é interrompida antes da formação de uma nova planta, sendo os grãos germinados submetidos a secagem, o qual ocorre por etapas, onde é retirado água até atingir teor de umidade final de 4 - 4,5%, o qual pode estabilizar as atividades enzimáticas do malte e induzir a reações de formação de cor (HU *et al.*, 2021; MEDEIROS *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2015). As variações da cor do malte (Figura 3) e sabores se dão pelo grau de secagem do grão, diferenciando em malte base, caramelo, especial B, coffee, dentre outros (REBELLO, 2009).

**Figura 3 - Variedades da coloração do malte (intensificação da tostagem da esquerda para a direita)**



Fonte: <https://ezbrew.com.br/wp-content/uploads/2021/01/texture-with-four-types-barley-malt-beer.jpg>

Na maltagem a parede celular do grão é amolecida e é estimulada a produção de enzimas diastásicas, as quais convertem o amido em extrato de malte. O malte é o insumo que trará os nutrientes necessários para a levedura realizar a fermentação, e é no momento da mosturação onde ocorre a elevação da temperatura do mosto promovendo a ativação das enzimas do malte e resultando na sacarificação do amido. Cada enzima trabalha em uma determinada faixa de temperatura como mostrado na Tabela 1 (LARSSON *et al.*, 2019).

A  $\alpha$ -amilase hidrolisa aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) em pontos internos da cadeia do amido, produzindo maltose, maltotriose e dextrinas. A  $\beta$ -amilase remove sequencialmente unidades de maltose da extremidade não redutora dessas grandes dextrinas. Enquanto isso, a LD (Limit Dextrinase) hidrolisa rapidamente pontos de ramificação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) dentro dessas moléculas de dextrina ramificadas para produzir dextrinas lineares que se tornam substratos disponíveis novamente para a  $\beta$ -amilase (YU *et al.*, 2020).

**Tabela 1- Principais enzimas envolvidas na brassagem, substratos, produtos e faixas ótimas de atuação**

Enzima	Substrato	Principais produtos	Faixa ótima de atuação (°C)
Beta-glucanase	Beta-glucanos		45-50
Proteases	Proteínas	Aminoácidos e peptídeos	45-52
Beta-amilase	Amido	Maltose	60-65
Alfa-amilase	Amido	Dextrinas	67-72

Fonte: Guimarães (2021)

### 3.2.3 Lúpulo – *Humulus lupulus*

O lúpulo é uma planta trepadeira que pertence à família das Cannabaceae, a qual apresenta crescimento consideravelmente rápido e pode atingir mais de sete metros em apenas cinco meses (Figura 4-a). A planta tem florescência anual em climas temperados, necessitando de exposição a luz de no mínimo 13 horas (MACHADO *et al.*, 2020)

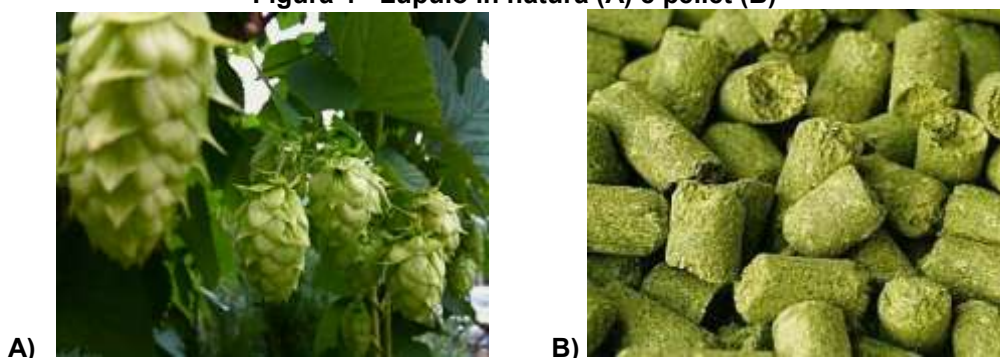
Nas plantas em seus cones é encontrada as glândulas de lupulina, que armazenam os metabólitos secundários (especializados) como os compostos fenólicos, terpenos, alfa-ácidos e beta-ácidos que desenvolvem as ações primordiais da planta. A indústria farmacêutica vem explorando a atividade anticancerígena destes polifenóis. Na indústria cervejeira, os compostos de maior interesse são os



alfa-ácidos, que trazem o amargor e os óleos essenciais que acrescentam os aromas característicos (GUIMARÃES, 2021).

Na fabricação da cerveja pode ser utilizado o lúpulo na forma de flor *in natura* ou na forma peletizada (Figura 4-b), que apresenta maior facilidade de compra e por ter uma maior durabilidade pode ser encontrada uma maior variedade. As diferenciações do lúpulo se dão pelas diferentes concentrações dos alfa-ácidos, óleo essencial e a região de plantio. O lúpulo traz características primordiais para a bebida como aroma, amargor, retenção da espuma e também propriedades bactericidas e bacteriostático. Tais propriedades são de responsabilidade dos iso-alfa-ácidos (ROSA; AFONSO, 2015).

Figura 4 - Lúpulo *in natura* (A) e pellet (B)

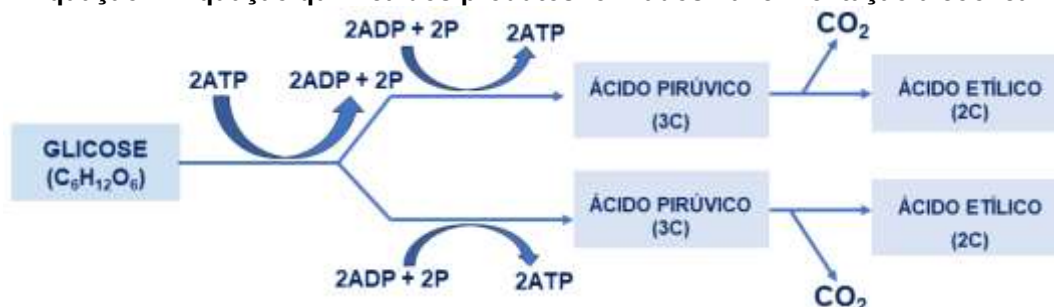


Fonte: [https://cria/eimportadora.files.wordpress.com/2015/07/3964386525\\_c7afd4dda9\\_o.jpg](https://cria/eimportadora.files.wordpress.com/2015/07/3964386525_c7afd4dda9_o.jpg);  
<https://www.poislbrew.com.br/wp-content/uploads/CASCADE.jpg>

### 3.2.4 Leveduras

As leveduras participam da parte mais importante da produção da cerveja que é a fermentação, transformando de forma anaeróbica os açúcares presentes no mosto em piruvato, o qual posteriormente é convertido em etanol e dióxido de carbono no processo chamado de fermentação alcoólica (SILVA, 2019).

Equação 1- Equação química dos produtos formados na fermentação alcoólica



Fonte: Autoria própria (2023).

A levedura mais utilizada para a produção cervejeira é a *Sacharomyces cerevisiae*, que proporciona excelente atividade fermentativa sobre os açúcares presentes no mosto cervejeiro e é capaz de manter os aromas essenciais da cerveja. Por não ter um poder aromático grande não alteram as características da cerveja, os quais outras leveduras não proporcionam. Na produção cervejeira já vem sendo utilizadas outras cepas do gênero *Sacharomyces*, como *S. eubayanus*, *S. uvarum* e *S. kudriavzevii*, as quais proporcionam características e aromas diferenciados que produzem novos estilos (COSTA; P. M. C. DA; ALMEIDA, *et al.*, 2019, GIANNAKOU; VISIONONI, *et al.*, 2021, TOLEDO; A. L.; SILVEIRA P. M; CAPUCI, 2018).

Além das cepas do gênero *Sacharomyces*, há a possibilidade de produzir cervejas utilizando leveduras não-*sacharomyces*, como o caso das *Brettanomyces bruxellensis* também conhecida por levedura selvagem. Já na produção de cervejas de baixo teor alcoólico ou sem álcool, têm sido descritas a utilização de leveduras como: *Candida spp.*, *Toluraspóra delbrueckii*, *Pichia (Scheffersomyces) spp.*, *Zygosaccharomyces spp* e *Saccharomycodes ludwigii*. Todas essas leveduras possuem características de serem maltose negativa, ou seja não consomem a maltose e maltotriose do mosto cervejeiro, e sim glicose e frutose, que são açúcares mais simples (BARGA, 2021, COSTA, V. L. L., HATA, *et al.*, 2021, LARROQUE; CARRAU, *et al.*, 2020).

### 3.3 OLIVEIRA: *OLEA EUROPAEA L.*

*Olea europaea L.* é uma planta da família das Oleaceae cultivada especialmente pelos seus frutos, a azeitona (Figura 5). O extrato das folhas desta planta apresenta atividades medicinais e na indústria de alimentos tem sido utilizado pela sua ação antioxidante em função dos compostos fenólicos que previnem reações oxidativas. A principal molécula responsável por estes benefícios é a oleuropeína, e em menor proporção o tirosol, o ácido cafeico e o hidroxitirosol (ACAR-TEK, N; AĞAGÜNDÜZ, 2020)

A oleuropeína, um glicosídeo caracterizado pelo sabor amargo e adstringência, está presente em abundância nas folhas, tronco e frutos. Este composto fenólico apresenta propriedades farmacológicas e biológicas como ação antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, potencial anticancerígeno, atividade

cardioprotetora e interfere no metabolismo de lipídios, reduz o peso e o estresse oxidativo (MENEZES, *et al.*, 2022).

**Figura 5 - Imagens da árvore e dos frutos da oliveira**



Fonte: <https://vejasp.abril.com.br/wp-content/uploads/2020/11/oliveira.jpg>

### 3.4 CERVEJA E OS SEUS BENEFÍCIOS

O alto consumo desta bebida aguça a curiosidade sobre as propriedades nutricionais e benefícios para a saúde humana. Uma de suas principais características é o grande teor de compostos fenólicos provenientes do lúpulo e do malte, o qual está diretamente ligado a prevenção do estresse oxidativo aos que a consomem, podendo ser ingerida na apresentação alcoólica, de baixo teor alcoólico e sem álcool (AMBRA, *et al.*, 2021).

A cerveja contém vitaminas do complexo B, traços de minerais, como cálcio, potássio e magnésio, além de polifenóis, que ajudam a manter a saúde e têm efeitos protetores contra doenças cardiovasculares. (RANI; BHARDWAJ, 2021).

A cerveja também é denominada de pão líquido por alguns autores, por apresentar um baixo teor alcoólico quando comparado com as demais bebidas alcoólicas (vinho, vodka, cachaça), e seus elevados níveis de carboidratos e proteínas, portanto sendo uma bebida altamente nutritiva. Pode ser utilizada como um excelente repositivo de eletrólitos para o organismo humano, onde um litro da bebida pode equivaler a 150 g de pão em carboidratos, e em 60 g de proteínas, podendo ser utilizada para corrigir as necessidades nutricionais humanas diárias de até 15% (ROSA; AFONSO, 2015).

A cerveja por ser uma bebida fermentada tem sua ação diretamente ligada à saúde gastrointestinal, reduzindo casos de disbiose, equilibrando a microbiota intestinal e agindo na saúde digestiva. Também apresenta atividade antioxidante, antiinflamatória, antiangiogênica, dentre outros. A maioria dos efeitos positivos de uma cerveja é transmitida através de seus componentes não alcoólicos. Os compostos não alcoólicos são derivados principalmente do malte e do lúpulo, e podem variar de acordo com o método de fabricação. Os compostos fenólicos, como chalconóides, flavonóides, fenólicos, ácidos orgânicos estão entre os ingredientes não alcoólicos mais conhecidos (OSORIO-PAZ *et al.*, 2019).

Segundo Castro-Sepulved *et al.*, (2016) a cerveja sem álcool pode ser utilizada como repositor hídrico e eletrolítico pré ou pós atividade física, sendo mais aceita pelos atletas que as bebidas esportivas e também economicamente mais viável. E em estudo realizando a reposição eletrólítica com água, cerveja alcoólica e não alcoólica, revelou com este comparativo que a cerveja sem álcool seria mais eficaz para realizar a manutenção na homeostase no corpo dos atletas do que os demais líquidos.

### 3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radicais livres são espécies químicas que podem ser fontes de diversos processos químicos e principalmente biológicos, os quais podem ser o cerne de algumas doenças, como câncer, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (ARUOMA, 1998). Indo de encontro a isso, antioxidantes primários são uma classe de compostos que possuem a habilidade de capturar radicais livres e reduzir os possíveis danos causados pelos mesmos (JORGE; LUZIA, 2009; WU *et al.*, 2020).

Compostos fenólicos são substâncias que podem ser facilmente extraídos de uma ampla gama de plantas (BURDA; OLESZEK, 2001), e podem apresentar diversas atividades biológicas positivas. Em especial, compostos fenólicos são caracterizados como substâncias que possuem de maneira geral um bom potencial antioxidante, se mostrando como compostos eficientes na captura de radicais livres a partir da doação de elétrons por meio do hidrogênio fenólico da hidroxila (GE *et al.*, 2020). Podem ser separados também pelo seu número de hidroxilas entre fenóis e polifenóis.

Os estudos de Abaza, *et al.*, (2011), El; Karakaya, (2009) e Lee; Lee, (2010) demonstraram claramente que os extratos obtidos a partir de folhas de oliveira são uma boa fonte de compostos fenólicos, em especial flavonóides, de forma que lhe conferem grande potencial para utilização voltada aos benefícios à saúde humana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EXTRATO DAS FOLHAS DE OLIVEIRA

Foi empregado extrato de folhas de *Olea europaea* L. disponível comercialmente com conteúdo de oleuropeína padronizado em 20%. O extrato foi adquirido em farmácia de manipulação legalmente registrada e licenciada junto aos órgãos competentes. A certificação de garantia da qualidade do produto fornecida pelo fabricante do extrato foi solicitada junto a farmácia fornecedora do produto.

### 4.2 ELABORAÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL

Para a elaboração da cerveja estilo *American Blonde Ale* foi utilizada como referência a metodologia descrita por Medeiros *et al.*, (2020) e Agraria-Malte, (2018), com pequena adaptação para a produção de uma cerveja de baixo teor alcoólico. A formulação a ser empregada está descrita da Tabela 2 e sua produção seguiu os padrões do guia de estilos *Beer Judge Certification Program* (BJCP) (M. M. BONACCORS, 2018). A técnica do *Cold mashing* empregada na etapa de mosturação teve como referência a metodologia descrita por Dalberto *et al.*, (2021).

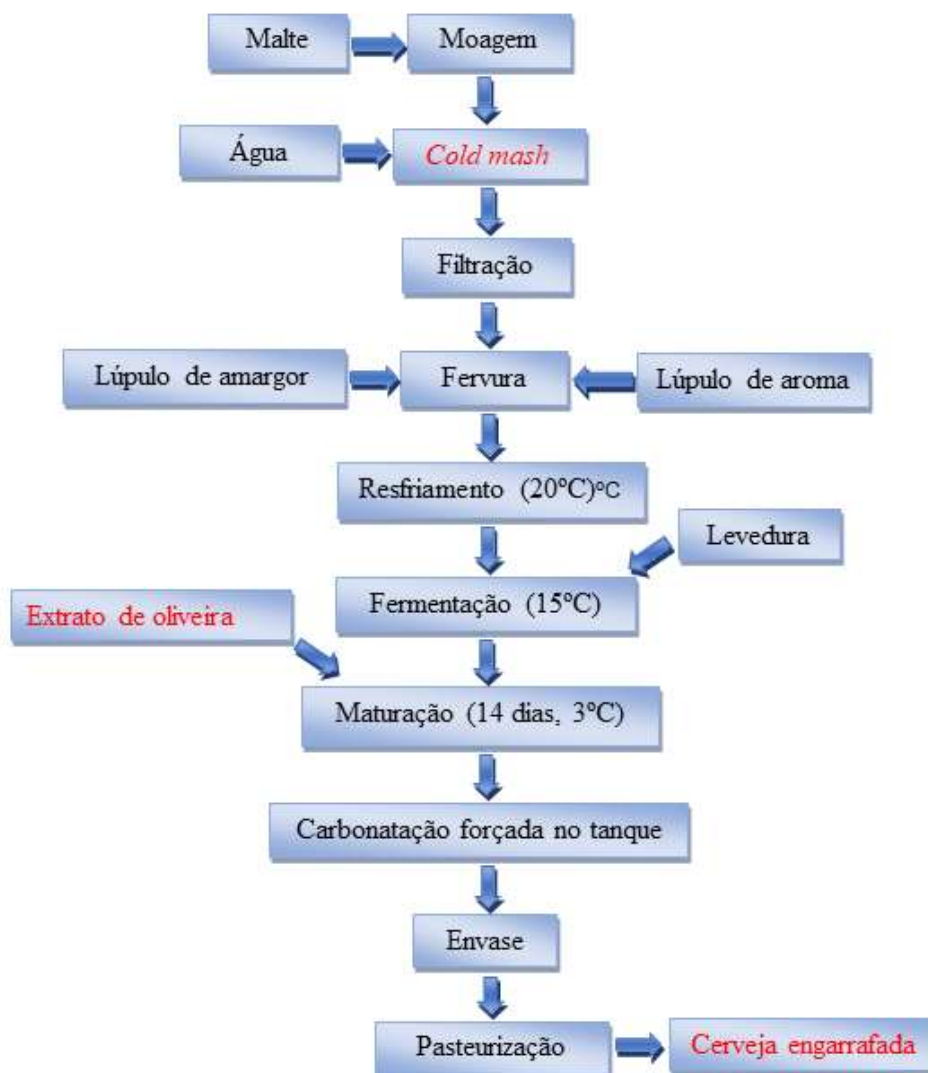
**Tabela 2 - Ingredientes para fabricação da cerveja *American Blonde Ale***

INGREDIENTES	QUANTIDADE
Malte Pilsen	130 gramas
Malte chateau melano	10 gramas
Lúpulo Nugget	0,25 gramas
Lúpulo Cascade	0,5 gramas
Fermento Ale (S-04)	0,575 gramas
Total de água	1 litro

Fonte: Autoria própria (2022)

O processo de fabricação da cerveja seguiu o fluxograma mostrado na Figura 6, com cada etapa sendo descrita nos itens subsequentes.

**Figura 6 - Fluxograma de fabricação da cerveja**



Fonte: Autoria própria (2023).

#### 4.2.1 Mosturação e/ou Brassagem

A mosturação também denominada de brassagem, é a etapa onde ocorre a extração dos açúcares do malte, os quais são assimilados pela levedura cervejeira durante a fermentação.

Nesta etapa todos os equipamentos e utensílios utilizados foram adequadamente higienizados e sanitizados com ácido peracético 0,2%. Um sistema

de fogareiros com três painéis de alumínio com capacidade de 50 litros fora empregado no processo. Para a moagem dos maltes Pilsen e chateau malano foi utilizado um moinho elétrico de rolo modelo 4RM-PREMIUM (Amantes da Breja, São Paulo, Brasil).

O malte moído foi transferido para uma panela contendo 30 litros de água potável pré-resfriada a 10°C. Para a brasagem a frio (*cold mashing*) a mistura malte-água permaneceu sob refrigeração (10 °C) em câmara fria com temperatura constante por aproximadamente 8 horas. O mosto ficou em um processo de recirculação por todo o período de brasagem a fim de acelerar o processo de extração dos açúcares. Esse processo de mosturação a frio garante menor extração dos açúcares fermentescíveis e uma melhor extração do aroma, cor e sabor do malte para a cerveja.

Ao término da mosturação foi realizado o processo de filtragem por meio de uma recirculação do mosto passando pela *bazooka* no fundo da panela que funcionou como um filtro realizando a limpeza do mosto. Em seguida, o mosto foi transferido para outra panela e submetido à fervura. Na mosturação não foi realizado nem uma rampa de temperatura, pois não é pretendido aumentar a extração dos açúcares, e nem a quebra do amido pelas enzimas, já que a produção em questão é de uma cerveja de baixo teor alcoólico, não havendo, portanto, tal necessidade.

**Figura 7 - Técnica do cold mashing (brassagem a frio)**



Fonte: Aatoria própria (2023)

#### 4.2.2 Fervura

O processo de fervura do mosto filtrado ocorreu em panela de 30 L e em fogareiro. Após 5 min de fervura foi realizado a primeira lupulagem (lúpulo de amargor), com adição do lúpulo *Nugget* (0,25 g/L) e sendo mantida a fervura por 60 min. Na sequência foi feita a segunda lupulagem (lúpulo de aroma / tardio) com adição do lúpulo *Cascade* (0,5 g/L) e encerramento da fervura. Essa inserção do lúpulo garante o amargor e a aromatização da cerveja.

#### 4.2.3 Resfriamento

Após o processo de fervura, o processo de *Whirlpool* foi realizado, onde com auxílio de uma pá e movimentos circulares é produzido um redemoinho no mosto, o que acelera a decantação das partículas suspensas. Após processo de *Whirlpool* o mosto é deixado em repouso por 5 min para decantar o *trub* (coágulos proteicos e material vegetal do lúpulo). Através de um trocador de calor (*chiller*), o mosto foi retirado da panela e resfriado até aproximadamente 20°C.

#### 4.2.4 Fermentação

O processo de fermentação foi conduzido em balde fermentador com *Airlock*. O balde foi inicialmente sanificado com solução de ácido peracético e enxaguado com água esterilizada.

No balde fermentador sanificado foi acondicionado o mosto (20 L) e acrescentado a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento *Ale* S-04, 0,575 g/L) em quantidade recomendada pelo fornecedor para a quantidade de mosto produzido. O balde fermentador foi vedado com a tampa contendo *Airlock* tipo S, o qual possibilita a saída do gás carbônico formado durante o processo fermentativo e evita a entrada de ar e consequente oxidação da cerveja.

O sistema foi colocado sobre refrigeração entre 15 e 20 °C em geladeira com temperatura controlada por meio de um termostato digital. A densidade e o °Brix do mosto foi acompanhada por meio de um refratômetro, e a sua fermentação ocorreu de forma lenta por possuir uma baixa concentração de açúcares fermentescíveis, o que favoreceu a fermentação interrompida. O teor alcoólico foi



previamente estimado pelo potencial ABV ( $ABV (\%) = 131,25 \times (OG - FG) / 1000$ ) para que seja identificada o °Brix e/ou densidade de interrupção da fermentação, sendo interrompida com 1005 de densidade.

**Figura 8 - Tanque de fermentação de 25L**



**Fonte: Aatoria própria (2022)**

#### 4.2.5 Adição do extrato das folhas da oliveira.

Foram acrescentadas diferentes concentrações de extrato de oliveira no mosto fermentado (0,5%, 1% e 2% m/v). O extrato comercial foi disperso em pequena quantidade de mosto (250 mL) e então misturado a 5 L de mosto fermentado conforme as concentrações almejadas e descritas acima.

**Figura 9 - Tanques de maturação com adição do extrato**



**Fonte: A autoria própria (2022)**

#### 4.2.6 Maturação

Na etapa de maturação a temperatura foi reduzida para 3 °C onde aconteceu além da maturação, a clarificação durante aproximadamente 14 dias. Nesta etapa os mostos acrescidos do extrato vegetal foram mantidos em geladeira com controle de temperatura por termostato digital.

#### 4.2.7 Carbonatação, envase e pasteurização

Ao término da maturação, as cervejas foram transferidas para barris com capacidade de 10 L, e submetidas à carbonatação forçada com auxílio de cilindros de CO<sub>2</sub> que foram acoplados aos barris, com pressão constante (1 kgf/cm<sup>2</sup> de CO<sub>2</sub>) sendo controlada por válvula de pressão modelo FR-420B/FSA (Famabras, São Paulo, Brasil) por cinco dias a 3°C.

As cervejas após a carbonatação foram envasadas em garrafas de vidro âmbar de 600 mL previamente sanitizadas com ácido peracético 0,2%. O envase foi feito sob pressão utilizando um sistema de extração constituído por um cilindro de

CO<sub>2</sub> acoplado a uma válvula extratora, mangueiras de conexão e uma envasadora por contra pressão para garrafas modelo TIPO PEGAS (All Brew, Erechim, RS, Brasil).

Após a carbonatação as garrafas envasadas foram pasteurizadas por meio de imersão em água a 62 °C por 20 minutos, seguida de um resfriamento em água a 10 °C. As cervejas carbonatadas e pasteurizadas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até análises.

**Figura 10 - Cerveja pronta e envasada**



**Fonte: Autoria própria (2023)**

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA

As análises físico-químicas que foram realizadas nas cervejas adicionadas de extrato vegetal (0,5%, 1% e 2%) e a cerveja controle (sem adição de extrato) são: cor (EBC), acidez volátil, pH final, teor alcoólico, unidades de amargor (IBU), extrato aparente, extrato real e primitivo, densidade, calorias, fenólicos totais, polifenólicos totais, potencial antioxidante (protocolos ABTS, DPPH, FRAP) e compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para realização das análises as amostras passaram por um processo de decarbonatação, e a cerveja foi mantida a 20-25°C. Para realizar o processo de decarbonatação as amostras foram transferidas para um béquer e submetidas a banho de ultrassônico, por 15min. Para retirar algum material suspenso foi realizado a filtragem da cerveja através de um filtro seco (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

As análises físico-químicas de teor alcoólico, extrato aparente, real e original, amargor, pH, densidade, cor, calorias e acidez volátil, foram encaminhadas ao laboratório da cerveja de Belo Horizonte/MG, utilizando a metodologia oficial da ASBC (2023) e as demais análises foram realizadas na UTFPR campos Pato Branco.

#### 4.3.1 Determinação da cor (EBC)

Para avaliação da cor da cerveja, foi primeiramente utilizado um Espectrofotômetro de precisão. As amostras foram filtradas em filtro de membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  e colocadas em cubetas de vidro de 10,0 mm, para posterior leitura da absorvância, realizada a 430 nm em espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta-visível. O cálculo da absorvância da cerveja para o caminho da luz de  $\frac{1}{2}$  pol. ( $A_{\frac{1}{2}}$ ) multiplicando o A encontrado pela proporção de  $\frac{1}{2}$  pol. para a espessura da coluna de cerveja na cubeta usada (ASBC, 2023).

Cor da cerveja por SRM = 10 ( $A_{\frac{1}{2}}$  430 nm)

Equação 2

Onde:

- Fator de conversão de 10 mm para espessura de  $\frac{1}{2}$  pol. = 1,27.
- ( $A_{\frac{1}{2}}$ , 430 nm) = 1,27  $\times$  absorvância.
- Para converter de SRM para EBC, utilizar o resultado obtido e multiplicar por 1,97.

#### 4.3.2 pH final

A determinação do pH final foi realizada com a amostra de cerveja descarbonatada e em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por meio de um peagâmetro previamente calibrado, sendo introduzido os eletrodos na amostra e registrado o pH da cerveja (ASBC, 2023).

### 4.3.3 Determinação de acidez volátil

A determinação do teor de ácidos orgânicos voláteis foi realizado pela técnica de volumetria de neutralização (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

No cálculo da acidez volátil foi determinada a diferença entre a acidez total e a acidez fixa. E o resultado expresso em g de ácido acético por 100 mL de amostra.

Cálculo:

$$A_v \times 100 / G = \text{Ácidos voláteis} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

- $A_v = A_t - A_f$ , em g de ácido acético por 100 mL de amostra
- $A_t$  = ácidos totais
- $A_f$  = ácidos fixos
- $A_v$  = ácidos voláteis
- $G$  = graduação alcoólica

Inicialmente foi calculado a acidez total. Este método baseia-se na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada alcalina, com o uso de indicador fenolftaleína ou com o pHmetro até o ponto de equivalência. A acidez total é expressa em g de ácido acético por 100 mL de amostra. Para realizar o processo foi transferido 50 mL da amostra para um frasco Erlenmeyer e em seguida adicionado 0,5 mL do indicador fenolftaleína para posterior titulação com solução de hidróxido de sódio até coloração rósea ou até ponto de viragem pH 8,2 - 8,4 com auxílio de um pHmetro.

Cálculo:

$$n \times M \times f \times PM / 10 \times V = \text{Ácidos totais} \quad \text{Equação 4}$$

- $n$  = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL
- $M$  = molaridade da solução de hidróxido de sódio
- $f$  = fator de correção da solução de hidróxido de sódio
- $PM$  = peso molecular do ácido acético (60g)
- $V$  = volume tomado da amostra, em mL

Em seguida foi determinada a acidez fixa, que envolve a evaporação da amostra seguida de uma titulação dos ácidos residuais. Para realização do método foi pipetado 50 mL da amostra e transferida para uma cápsula de porcelana que foi levada para banho-maria. Em seguida água foi adicionada cuidadosamente pelas paredes da cápsula; lavando o resíduo e seguindo com a evaporação até quase total desidratação. O resíduo obtido foi transferido com auxílio de 100 mL de água para um frasco Erlenmeyer e então titulado com solução de hidróxido de sódio, como descrito na metodologia de acidez total. Os cálculos para determinação da acidez fixa seguiram a Equação 3.

#### 4.3.4 Teor alcoólico (% de álcool v/v)

O conteúdo de etanol foi determinado por cromatografia gasosa, seguindo metodologia oficial descrita pela ASBC (2023). Para a realização deste método foi utilizado 5 mL da amostra descarbonatada e filtrada em um balão com 5ml de n-propanol, após foi agitado a solução e encaminhado para inserção no cromatógrafo uma alíquota de 0,2µl da amostra diluída. O tempo de análise é de aproximadamente 3,5 min, com o eluente etanol a 1 min e o n-propanol em 1,6 min.

A temperatura da coluna deve ser ajustada para ficar próxima a esses tempos de retenção. Após a leitura foram realizadas as medições de altura dos picos e o cálculo descrito na Equação 5.

$$\text{Etanol, \% (v/v)} = \frac{\text{altura do pico etanol} / \text{altura do pico n-propanol}}{F} \quad \text{Equação 5}$$

F = (altura do pico etanol / altura do pico n-propanol) equivalente a 1% etanol (v/v) da curva de calibração.

#### 4.3.5 Teor calórico (Kcal/100mL)

Para estimar o teor calórico da cerveja foi realizado o cálculo à partir do teor alcoólico por peso, extrato real e teor de cinzas da cerveja (ASBC, 2023).

Cálculos:

$$\text{Calorias (kcal) /100 ml de cerveja} = 6,9(A) + 4 (B - C). \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

- A = Álcool, % em peso,
- B = Extrato real, % em peso,
- C = Teor de cinzas, % em peso.

#### 4.3.6 Densidade relativa.

Foi avaliada em densímetro digital, que determina uma densidade precisa de líquidos e gases, onde a densidade é calculada automaticamente por um processador aritmético integrado.

Para realização da análise a amostra foi injetada em um tubo por meio de uma seringa hipodérmica, para evitar a introdução de gás ou sólidos aprisionados no líquido e vir a interferir na leitura, e em seguida o densímetro foi introduzido no tubo (ASBC, 2023).

#### 4.3.7 Unidades de amargor (IBU)

Metodologia descrita na ASBC (2023) foi seguida para a determinação das unidades de amargor da bebida. Inicialmente 10 mL da cerveja foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL com auxílio de uma pipeta volumétrica com a ponta imersa em pequena quantidade de álcool octil (1-Octanol) (reagente c). Na sequência foi adicionado 1 mL de HCl 3 mol/L (reagente b) e 20 mL de 2,2,4-trimetilpentano (reagente a), e a mistura foi submetida a agitação por 15min. Leituras de absorção foram realizadas em cubetas de quartzo de 10 mm e em espectrofotômetro de absorção molecular em 275 nm. Os resultados foram calculados seguindo Equação 7 e foram expressos em Unidades de Amargor (I.B.U.).

$$\text{Amargor (IBU)} = \text{absorbância } 275 \times 50 \quad \text{Equação 7}$$

#### 4.3.8 Extrato aparente, real e original.

A densidade relativa a 20/20 °C foi determinada diretamente na amostra com auxílio de um densímetro digital. O valor da densidade relativa encontrado foi convertido em extrato aparente conforme correlação descrita na Tabela 3 (Anexo 1) e expresso em g de extrato por 100 g de solução (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O extrato real corresponde a todos os sólidos da composição da cerveja, para calcular foi realizado a pesagem do resíduo seco de um certo volume de amostra que foi submetida à evaporação. O método consiste na transferência de 20 mL de amostra descarbonatada, para uma cápsula de níquel previamente aquecida em estufa a aproximadamente 100°C por 1 hora, resfriada em dessecador e pesada. A amostra foi levada para aquecimento em banho-maria até a secagem. Após foi levada à estufa a 100°C por 1 hora, seguindo de um resfriamento à temperatura ambiente em dessecador para posterior pesagem (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Cálculo:

$$100 \times P / V = \text{extrato real \% m/v} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

- P = massa do resíduo, em g
- V = volume da amostra, em mL

O extrato primitivo ou original é o extrato inicialmente presente no mosto antes da fermentação. Para seu cálculo, os valores de teor alcoólico e extrato real previamente obtidos foram utilizados. Segundo a fórmula de Balling (Equação 9) onde é possível relacionar a porcentagem de álcool em peso (P) com a porcentagem de extrato real (Er) para chegar ao valor do extrato primitivo, expresso em porcentagem de massa. O resultado foi considerado até a primeira casa decimal (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$EP \% (m/m) = [(P \times 2,066) + Er] \times 100 / [100 + (P \times 1,066)] \quad \text{Equação 9}$$



A equação 9 baseia-se no balanço de massa da fermentação alcoólica, ou seja, a relação química da conversão de açúcares fermentáveis em álcool, dióxido de carbono e a biomassa da levedura. Teoricamente, 1,0 g de açúcar fermentável, considerando que o crescimento celular das leveduras, rende 0,46 g de etanol e 0,44 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 CO<sub>2</sub> e 0,11 g de levedura. 0,9565 g e 0,11 g somam 1,0665 g que é o extrato que não se converte em etanol.

#### 4.3.9 Estabilidade de espuma

Para avaliação da estabilidade de espuma a metodologia descrita por Kapp; Bamforth, (2002) foi empregada. O procedimento consiste em adicionar a um tubo de ensaio de 15 mL uma alíquota de amostra de 5 mL, o qual posteriormente foi fechado e agitado manualmente 10 vezes em um arco de 40 cm com oscilações por no máximo 3 segundos. Após o procedimento a tampa foi removida e a espuma medida, sendo considerada a distância do topo da espuma até o início do líquido em mm. Após 30min repetiu-se o procedimento de medição. A análise foi realizada em triplicata e calculado a média para obter o resultado, que foi expresso em porcentagem de redução de espuma após o período de 30 min.

#### 4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS POR CLAE

A quantificação de compostos bioativos como ácidos fenólicos e flavonoides foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), baseando-se no método descrito por Savi *et al.*, (2020). A análise foi conduzida em sistema Varian LC-920, com coluna de fase reversa Agilent Microsorb-MV 100-5 C18 RP (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm) com detector de arranjo de diodos e fase móvel em modo gradiente. Foram utilizados padrões cromatográficos autênticos e as concentrações da cada componente foram determinadas por correlação com tempos de retenção verificadas em curvas padrões. A fase móvel (A) é constituída de água ultrapura e (B) água: acetonitrila: água (2:40:58 v/v). E a amostra foi injetada com um volume de 10 µL por amostra com vazão da fase móvel 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura do forno 30 °C. O gradiente foi feito da seguinte forma: Inicia em 5 % de

fase B, em 2 min 20 % de B, em 15 min 25 % B, 25 min 85 % B, 30 min 95 % B, 33 min 20 % B e a partir de 36 min 5 % de B até 45 min.

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 ferrúlico, 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.

#### 4.5 FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos totais presentes na bebida foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, LAMUELA (1999). A análise foi realizada em tubos de ensaio, por meio da mistura de 0,5 mL das amostras com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 100 mL<sup>-1</sup>. As misturas repousam por cerca de 5 minutos. Após esse descanso 2,0 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 40 mg mL<sup>-1</sup> foram adicionados, seguido de um novo repouso de 2 horas em ambiente escuro. Ao término das 2 horas, inicia-se as leituras no equipamento das amostras e do branco, em cubetas de quartzo de 10 mm e comprimento de onda fixo de 740 nm. O branco é composto por 0,5 mL de água destilada, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio. Com os resultados da análise foi possível realizar a quantificação dos compostos fenólicos totais, por meio de uma curva analítica padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 100 mg L<sup>-1</sup>, diluídas em água destilada. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por litro de cerveja.

#### 4.6 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:

$$P = A * 820 * F \quad \text{Equação 10}$$

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

#### 4.7 CAPTURA DE RADICAL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL)

Para avaliar a atividade antioxidante das amostras, inicialmente foi empregada a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS *et al.*, (1995) para captura de radicais DPPH.

A mistura reacional é realizada em tubos de ensaio pela adição de 0,5 mL da amostra, 3,0 mL de etanol absoluto e 0,3 mL de uma solução do DPPH• (radical livre) em etanol, na concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. Após, a mistura foi armazenada por cerca de 45 minutos no escuro em temperatura ambiente, para então ser alocada em cubetas de quartzo de 10 mm e lida a um comprimento de onda fixo de 517 nm, usando etanol absoluto como branco. A curva padrão foi construída com Trolox em concentrações variando de 10 a 500 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por litro de cerveja (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, *et al.*, 1995).

#### 4.8 POTENCIAL DE REMOÇÃO DO RADICAL ABTS

O ensaio foi conduzido pelo método descrito por RE *et al.*, (1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> foi obtido pela reação de uma solução de 5 mL ABTS (7 mmol/L) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (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 misturada 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.

#### 4.9 CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO ÍON FÉRRICO (FRAP)

A análise do poder antioxidante de redução do ferro foi realizada com base na metodologia de Benzie e Strain, (1996). Inicialmente, soluções de HCl 40,0 mmol L<sup>-1</sup>, TPTZ 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, cloreto Férrico 20,0 mmol L<sup>-1</sup>, tampão acetato 0,3 mol L<sup>-1</sup> (pH 3,6) e solução padrão de sulfato ferroso 2,0 mmol L<sup>-1</sup> foram preparadas. Pela reação de 25 mL de tampão acetato com 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL da solução aquosa de cloreto férrico o reagente FRAP foi formado.

As análises foram conduzidas em ambiente escuro, misturando 90 µL das amostras com 270 µL de água destilada e 2,7mL do reagente FRAP em tubos de ensaio. A mistura foi homogeneizada com auxílio de vórtex e mantida em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 30 minutos. A leitura de absorvância foi realizada em cubetas de quartzo de 10 mm, a um comprimento de onda de 595 nm, utilizando a solução FRAP como branco. A curva analítica padrão foi construída com sulfato ferroso nas concentrações variando de 0,2 a 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg de sulfato ferroso equivalente por litro de cerveja.

#### 4.10 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica de coliformes totais na cerveja, foram encaminhadas ao laboratório LGQ de Francisco Beltrão/PR sendo realizadas com base na metodologia descrita na INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 26 DE

AGOSTO DE 2003 (BRASIL, 2003) onde estabelece o procedimento para a determinação do Número Mais Provável de coliformes em alimentos.

Para a realização da análise, foram inoculadas um volume de 1 mL de amostra em 3 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo laurel sulfato de sódio em concentração simples. Em sequência foi realizado uma diluição da amostra, onde é introduzido 1 mL em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina peptonada 0,1% ( $10^{-1}$ ), a partir desta diluição efetuou-se as demais diluições desejadas em solução salina. Em seguida foi inoculado um volume de 1ml da amostra diluída ( $10^{-1}$ ) em uma série de 3 tubos contendo 10ml de caldo laurel sulfato de sódio e em seu interior um tubo de Durhan, onde a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan (mínimo 1/10 do volume total) ou efervescência quando agitado gentilmente,

Para a confirmação da presença de coliformes totais foi realizado uma inoculação de 200  $\mu$ l de cada tubo positivo para um tubo contendo 4 mL de caldo verde brilhante bile lactose 2% e posterior incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . A presença de gás nos tubos de Durhan do caldo verde brilhante evidencia a fermentação da lactose presente no meio. Anotou-se o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

A partir da combinação dos números, correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo para os testes confirmativos, realizou-se a verificação da concentração na tabela de NMP (Anexo 2). Os resultados obtidos foram expressos em NMP/mL.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Artigo 1:** Low-alcohol light beer enriched with olive leaves extract: cold mashing technique associated with interrupted fermentation in the brewing process

Eliziane Cappelin<sup>a</sup>, Daiane Meneguzzi<sup>b</sup>, Diogo Henrique Hendges<sup>b</sup>, Tatiane Luiza Cadorin Oldoni<sup>b</sup>, Marina Leite Mitterer Daltoé<sup>b</sup>, Robert F. H. Dekker<sup>c</sup>, Mario Antônio Alves da Cunha<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná R, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Beta-Glucan Produtos Farmoquímicos-EIRELI, Lote 24<sup>A</sup> - Bloco Zirconia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Avenida João Miguel Caram, 731, CEP: 86036-700, Londrina, Paraná, Brazil

**Declarations of interest: none**

### ORCID NUMBERS:

Eliziane Cappelin: 0000-0002-4385-1601. e-mail: elizianecappelin@gmail.com

Daiane Meneguzzi: 0000-0002-0449-6512. e-mail: daiameneguzzi@hotmail.com

Diogo Henrique Hendges: e-mail: diogoprofessorcervejeiro@gmail.com

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni: 0000-0002-5187-6032. e-mail: tatianeoldoni@utfpr.edu.br

Marina Leite Mitterer Daltoé: 0000-0002-6761-9321. e-mail: marinadaltoe@utfpr.edu.br

Robert F. H. Dekker: 0000-0002-3787-6917. e-mail: xylanase@gmail.com

Mário Antônio Alves da Cunha: 0000-0002-1589-7311. e-mail: mcunha@utfpr.edu.br

---

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

**Background:** Beer is the most consumed alcoholic beverage globally, and the demand for differentiated beers with peculiar characteristics has intensified among beer consumers, creating a significant market niche. In this study, we developed a low alcohol light craft beer enriched with olive leaves extract (*Olea europaea* L.). In the manufacture of beer, the cold mashing technique associated with intermittent fermentation was used. Different concentrations of olive leaves extract (0.5, 1.0 and 2.0%) were added in the maturation stage. The samples were characterized by physicochemical parameters, phenolic and polyphenolic content, bioactive compounds, antioxidant potential, and microbiological quality.

**Results:** The cold mash technique associated with interrupted fermentation provided a low-alcohol beer ( $\cong 1.3\%$ ). The bitterness dimension (19.0 to 23.2 IBU) and color (9 – 17 EBC) parameter were in accordance with the Beer Judge Certification Program (BJCP) for the *American Blond Ale*-style. The addition of the extract enriched the content of total phenolics (171.09 to 437.4 mg GAE/mL) and polyphenolic (221.4 to 729.0 mg/L). Coumaric, ferulic, and cinnamic phenolic acids were detected in appreciable amounts in beers. Oleuropein was the major compound in the beverage and plant extract. After adding 2% extract, the ABTS and DPPH radicals scavenging activity, as well as the ferric reduction power, increased in beers by 28.4%, 449.1%, and 120.5%, respectively.

*Conclusions:* The extract of *Olea europaea* L. promoted the enrichment of low-alcohol beer samples with bioactive compounds and antioxidant potential. The obtained results indicate the potential use of *Olea europaea* L. extract as a natural oxidant in other beverages and food products.

**Keywords:** Antioxidant, Bitterness, Cold mash, Interrupted fermentation, Phenolics, Plant extract.



## 1. Introduction

Beer is one of the most consumed beverages in the world, gaining notoriety in the Brazilian market since it was introduced in the country. According to the Brazilian Beer Industry Association, the country ranks third in annual beer production, having produced more than 14 billion liters in 2021 [1]. Global beer consumption reached 185.6 million kiloliters in 2021, and the Chinese market is the largest consumer of that beverage (360 million hectoliters), followed by the North American market (241 million hectoliters) [2].

Non-alcoholic and low-alcohol beers are also part of this market segment. According to the National Association of the Beer Industry [3] the consumption of non-alcoholic beers increased 30% in 2021, reaching a total consumption of 257 million liters per year. This shows an emerging market and opening space for the production of new varieties of non-alcoholic and low-alcohol beverages. The worldwide non-alcoholic beer market expanded from \$18.44 billion in 2022 to \$20.16 billion in 2023, reflecting a compound annual growth rate (CAGR) of 9.3% [4].

The rapid growth of the non-alcoholic beer market is associated with several factors, including new beverages and traffic rules and legislation, health concerns, and religious motives. Within this framework, efforts have been made to produce non-alcoholic and low-alcohol beverages that maintain the same palatable sensations as their alcoholic counterparts [5,6].

Non-alcoholic beers can have an alcoholic strength by volume (ABV) of up to 0.5%. On the other hand, in many countries such as the United Kingdom and USA, beverages with an alcoholic strength of 0.5% to 1.2% by volume are considered low-alcohol beers [7]. In Brazil, beers with up to 2.0% (v/v) alcoholic strength are classified as low-alcohol beers [8].

Producing high-quality non-alcoholic or low-alcohol beers with an attractive sensorial profile is still challenging, but the industry has sought new production methods that focus on improving these beers' flavor and aromatic profile. The cold mashing technique is an alternative for producing low-alcohol beers, which aims to extract the flavor and color of the malt, leaving more body to the beer. This technique also decreases the extraction of fermentable sugars, being favorable for obtaining a

low-alcohol beer, and can be used in conjunction with interrupted fermentation to produce alcohol-free beer [7,9].

Cold mashing is a relatively uncommon technique that is employed primarily by a select group of experimental microbreweries to craft unique beer specialties. In this method, malt and water are blended without additional heating. Following this, the wort (extract) and brewers' grain are separated, bypassing the traditional resting or partial mashing warming steps. After the cold mashing and lautering, the resulting wort is brought to a boil to eliminate undesirable germs, mirroring the conventional brewing process [10].

Beer can be classified in different ways, one of which is associated with the fermentation process that is carried out, including the different types of yeast used and the temperature of the process [11,12]. According to the Beer Judge Certification Program, each style must follow a standard and specific characteristics based on the BJCP style guide [13].

Within the group of *Ale* beers, the *American Blonde Ale* is an American craft beer that is refreshingly easy to drink due to its light flavor, with malty notes, and a soft touch of hops, and is very suitable for drinking in the heat. It has a pale yellow to golden color, with white foam of up to medium volume; the bitterness intensity is between low and medium [13,14], with attractive fruit, hop, or character malt notes. Well-balanced and clean, it is a refreshing pint without aggressive flavors. Smooth without harsh bitterness or astringency, and medium to high carbonation. Finishes medium-dry to somewhat sweet, and no diacetyl. According to the Beer Judge Certification Program, the *American Ale* beer style has a bitterness of 15 to 28 IBU, SRM (Standard Reference Method) between 3 and 6, OG (Original Gravity) between 1.038 and 1.054, FG (Final Gravity) between 1.008 and 1.013, and ABV (alcohol by volume) ranges from 3.8% to 5.5% [13].

The high consumption of this beverage heightens curiosity about its nutritional properties and benefits for human health. One of its main characteristics is the high content of phenolic compounds from hops and malt, which is directly associated with the prevention of oxidative stress in those who consume it, and can be ingested in an alcoholic, low-alcohol, and alcohol-free presentation [15].

Phenolic compounds can present several biological activities and are characterized as substances that generally have good antioxidant potential, being

efficient in capturing free radicals [16]. The studies by González *et al.* (2019) [17], Ciont *et al.* (2023) [18], and Alrugaibah *et al.* (2023) [19] demonstrated that the extracts obtained from olive leaves are a good source of phenolic compounds, especially flavonoids, which give them great potential to be used to benefit human health.

*Olea europaea* L. is a plant from the Oleaceae family that is cultivated primarily for its fruit, the olive. The extract from this plant's leaves has medicinal activities. In the food industry, it has been used for its antioxidant action due to phenolic compounds that prevent oxidative reactions. The central molecule responsible for these benefits is oleuropein and, to a lesser extent, tyrosol, caffeic acid, and hydroxytyrosol [20].

Oleuropein, a glycoside characterized by its bitter taste and astringency, is abundant in the leaves, trunk, and fruits. This phenolic compound has pharmacological and biological properties such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial action, anti-cancer potential, and cardioprotective activity. It interferes with lipid metabolism and reduces weight and oxidative stress [21].

Thus, this study aimed to develop and characterize a low alcohol light craft beer incorporated with commercial olive leaf (*Olea europaea* L.) extract. The main focus was to enrich the beverage with bioactive compounds with antioxidant, antimicrobial, and cardioprotective properties. The physicochemical quality parameters and dimension were: color (EBC), final pH, total acidity, alcohol content (ABV), international bitterness units (IBU), apparent extract, real extract, total phenolic and polyphenolic contents, phenolic acid, and antioxidant potential were evaluated in the beer samples.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Inoculum preparation and fermentation process*

The commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Ale S-04. Fermentis - Lesaffre. France) was used as a fermenting culture in wort fermentation to obtain low-alcohol beers. The lyophilized yeast was rehydrated in a small amount of wort

and used as an inoculum at a concentration of 0.575 g/L<sub>wort</sub>, following the manufacturer's recommendations.

The lyophilized *Olea europaea* L. extract containing 20% oleuropein was purchased from a company specialized in vegetable extracts and natural products (ActiveCaldic Company, Paloça, SC, Brazil).

The brewing process followed the standards recommended by the beer style guide of the Beer Judge Certification Program (BJCP) [13], seeking to produce a beer of low-alcohol, but with flavor characteristics that are similar to the *American Blonde Ale* style. A batch of beer was produced on a pilot scale in a microbrewery in the city of Salgado Filho, Paraná, Brazil. In the brewing process, a three-block system consisted of a stove and three pans with a capacity of 50 liters was used. Batches of 30 L of beer were produced by using Patogonia Pilsen and Chateau Melano malts (Vêneto Mercantil. Flores da Cunha. Brazil). The malt was broken in a 4RM-PREMIUM electric roller mill (Amantes da Breja, SP, Brazil).

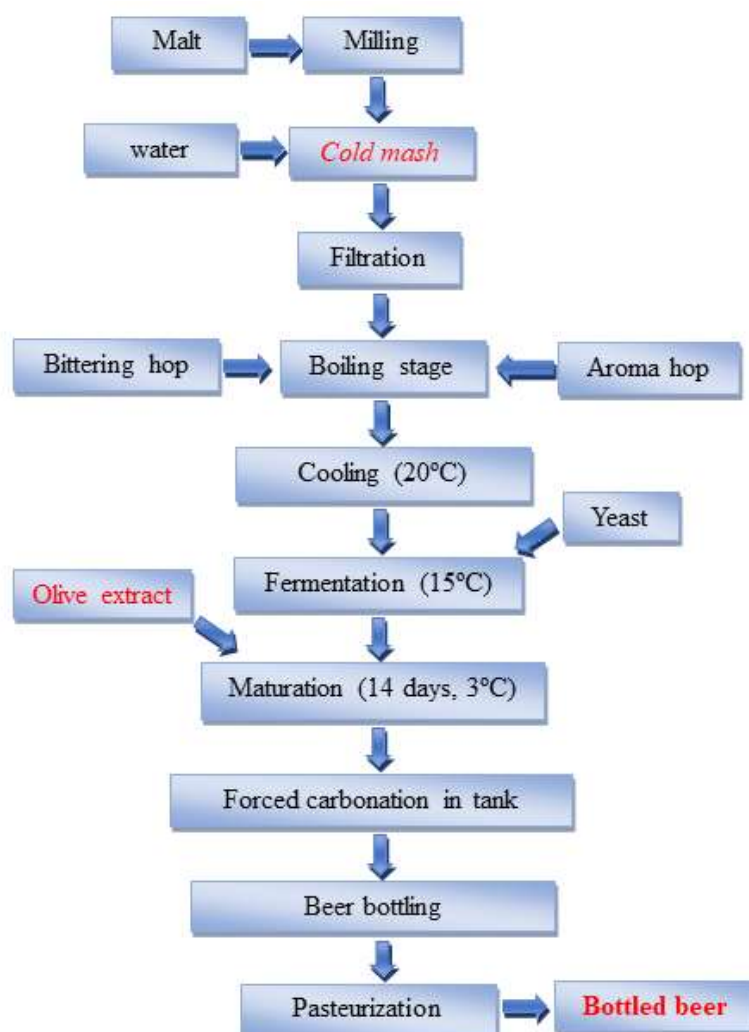
The cold mashing technique was used to prepare the wort, which consists of cold mashing under a controlled temperature (10 °C) for 8 hours, according to the methodology described by Dalberto *et al.* (2021) [9]. In the mashing stage, the wort was recirculated through the brewer's spent grain by using a recirculating pump that was previously sanitized with peracetic acid (0.2%). After cold mashing, the wort was boiled for 60 minutes, hopping being carried out after 5 minutes of boiling (0.25 g/L, bittering hop) and at the end of the process (0.5 g/L, aroma hop). Nugget and Cascade hops (Barth Haas - LNF Latino América, Brazil) were used as bittering and aroma hops, respectively.

The hopped wort was cooled to 20 °C, inoculated with yeast (0.575 g/L<sub>wort</sub>), and fermented at a temperature of 15 °C until the fermented broth reached a 1.005 g/cm<sup>3</sup> density. Fermentation was carried out in a fermentation bucket with airlock placed inside a refrigerator with a temperature (15 °C) that was controlled by thermostat.

*Olea europaea* L. extract at concentrations of 0.5%, 1.0%, and 2.0% (w/v) were added to the beers in the maturation stage, which occurred under atmospheric pressure for 14 days at 3 °C. After maturation, the beers were transferred to barrels with a capacity of 10 L and subjected to forced carbonation with CO<sub>2</sub> cylinders attached to the barrels. Carbonation occurred under constant pressure (1 kg/cm<sup>2</sup> of CO<sub>2</sub>) controlled by a pressure valve model FR-420B/FSA (Famabras, SP, Brazil) for five days at 3°C. The carbonated beer was bottled in 600 mL amber glass bottles that

were previously sanitized with 0.2% peracetic acid. The bottling was conducted by using a counter-pressure filling machine for PEGAS model bottles (All Brew, Erechim, RS, Brazil).

The carbonated bottles were then subjected to slow pasteurization (62 °C, 20 min), and they were kept under refrigeration at 4 °C until analysis. Fig. 1 shows the flowchart of the brewing process we followed in this study.



**Fig. 1.** Flowchart of the brewing process.

## 2.2. Physicochemical quality and microbiological analyses

Beer samples were decarbonised before physicochemical analysis by sonication in an ultrasonic bath (ME18163A01, Cristófoli, Brazil) for 15 minutes, and filtered on Whatman® grade 1 qualitative filter to remove any suspended particles.

The physicochemical analyses that were carried out on the control beer samples (B0: without extract addition) and beers enriched with *Olea europaea* L. extract (B05: 0.5%, B1: 1%, and B2: 2% w/v) were: EBC (European Beer Color, ASBC Beer-10 method), volatile acidity (neutralization volumetry), final pH (ASBC Beer-2 method), alcohol content (gas chromatography, ASBC Beer-4 method), international bitter units (IBU, ASBC Beer-10 method), apparent extract (ASBC Beer-3 method), real extract (ASBC Beer-5 method) and original extract (ASBC Beer-6 method), density (ASBC Beer-2 method), calories (ASBC Beer-33 method) [22]. Foam stability was analyzed following the protocol described by Kapp and Bamforth [23].

The microbiological quality of the beer samples was evaluated by searching for coliforms at 35 °C, following the requirements of the Brazilian law [24].

### *2.3. Analysis of antioxidant activity, total phenolics, polyphenolics and phenolic compounds (HPLC)*

The antioxidant potential of *Olea europaea* L. extract and beer samples was evaluated by the ability to scavenge ABTS [25] and DPPH [26] radicals, as well as by the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) [27], following the methods that are described in the scientific literature. Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method [28] and the polyphenol content was evaluated following the protocol described by the European Brewery Convention [29]. Phenolic acids and flavonoids were analyzed through high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) following the previously described protocol [30].

## **3. Results and discussion**

### *3.1. Physicochemical and microbiological parameters of quality*

Table 1 shows the physicochemical quality parameters that we analyzed in beer samples without the addition of extract (B0) and with the addition of different concentrations of extract (B05, B1, and B2).

The alcohol content of the beer samples that were produced in this work ranged from 1.3% to 1.4% (v/v), therefore, they were classified as low-alcohol beers

according to the Brazilian legislation (Normative Instruction nº 65 of December 2019 of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) [8].

This study used the non-enzymatic cold mashing technique associated with the interruption of fermentation (interrupted fermentation) before yeast completely assimilated sugars as a tool to obtain a beverage with low-alcohol content. The process was ineffective for obtaining a non-alcoholic beer (up to 0.5% v/v of ethanol). However, it was possible to obtain a beer with a reduced alcohol content according to the Brazilian law.

A study described by Dalberto *et al.* (2021) [9] that used the cold mashing technique made it possible to obtain beers with alcoholic strength ranging from 0.97 to 2.35 % (v/v). The cold mashing technique contributes to reducing the wort boiling time and reducing the required mass of hops, which is advantageous from a cost-benefit point of view. Besides, beers that are produced through the cold mashing technique align with the trend towards creating beers with reduced alcohol content and fewer calories [10]. The obtained beers had a low caloric value (12 to 15 Kcal/100 mL) and adding olive leaf extract did not promote changes in energy content. The obtained beers are classified as light beers since they present a caloric value less than 35 kcal/100ml according to Brazilian legislation [8]. It is worth noting that low-carb and low-alcohol beers are presented as healthier consumption options and have gained market share in recent years.

An analytical parameter that is widely used by brewers in the production of beers is the value of beer extract. Beer extract can be comprehended as real extract, apparent extract, and original extract. The real extract represents all the solids that are present in the beer and is related to the beverage's body, indicating the amount of sugars that is present. The apparent extract is a critical parameter in the fermentation of low-malt beer. This variable indicates the degree of fermentation because it corresponds to the total residual concentration of the three main assimilable sugars in the wort (glucose, maltose, and maltotriose). The brewing process concludes upon achieving the desired apparent extract concentration [31]. The original extract is the amount of substances (wort extract) of the wort that gives rise to the beer and is expressed in percentage (%) by weight [32].

All the obtained beer samples showed low values of real, apparent, and original extract, with no statistically significant differences between samples about apparent

and real extract at a 95% significance level ( $p < 0.05$ ). According to Brazilian legislation soft beer is the one that has an original extract equal to or greater than 5 and less than 10.5 percent, by weight. The beers produced in this study showed values of original extract between 2.8 °P (B05) and 3.7 °P (B0 and B2). This shows that the cold mashing technique promoted a reduced extraction of sugars, dextrans, and proteins from the malt, which made it possible to obtain a soft beverage with low caloric value and low alcohol content.

The bitterness of the beers ranged from 19.0 IBU (B2) to 23.25 IBU (B05) and is in accordance with the BJCP (Beer Judge Certification Program) [13] reference values for the *American Blond Ale* style. Bitterness is largely derived from the content of iso- $\alpha$ -acids that are generated during the boiling of the hop-added wort [33].

The beer samples' original gravity (OG), measured before wort fermentation, was 1.013 g/cm<sup>3</sup>. After fermentation, the density of the beers dropped to 1,005 g/cm<sup>3</sup> (final gravity, FG). The FG value we found in the produced beers is below the one that is recommended by the BJCP for the American Blond Ale style, which is justified by the reduced content of extracts in the beverage. The reduced content of extract in the beverage is due to a lower extraction of soluble solids from the malt by the cold mashing technique, hence a lower content of fermentable sugars in the wort.

Regarding the color of the beers, we noticed that adding plant extract intensified this parameter, with a variation of 9.0 EBC in samples B0 (control) and B05 (0.5% extract) to 15.0 EBC in the B1 samples (1% extract) and 17.0 in B2 (2% extract). In this context, the samples with the highest extract content (B1 and B2) do not fit into the *American Blonde Ale* style, whose limit value is 11.82 EBC [13].

Another interesting aspect is that adding the extract to the beer did not influence the values of pH (4.9 – 5.0) and volatile acidity (12.0 mEq/L).

The organic acids that yeast produces during fermentation are responsible for beers' acidity and impact the sensory acceptance of the beverage as they influence its flavor and aroma. Acetic acid constitutes the primary component of volatile acids that are found in beer. Typically falling within the 57-145 mg/L range, its threshold varies between 71 and 200 mg/L across beer varieties. The presence of acetic acid imparts an unfavorable taste to beer and if its concentration surpasses the taste threshold, it can lead to a considerable drop in quality [34].



Foam stability is a crucial element of beer quality and is valued by consumers and brewers. Adding 0.5% and 1% extract in beer does not contribute to a change in foam stability. On the other hand, when 2% extract (B2) was added, the foam percentage reduced 67%. Higher concentrations of the extract could decrease the system's surface tension, promoting instability in the foam. A particular study conducted by Guglielmotti *et al.* (2020) [35] showed that including *Olea europaea* L. leaves in beer samples significantly elevated polyphenol content. This increase in polyphenols was associated with an enhanced colloidal instability of the beer.

The surface tension, viscosity, and density of the beer play pivotal roles in the formation, motion, and surface stability or lifetime of the bubbles [36]. Aliyari *et al.* (2022) [37] discovered a noteworthy correlation between the foaming characteristics of protein dispersions and surface hydrophobicity. Their research revealed a distinct inverse relationship between the level of surface hydrophobicity and the foaming capacity of protein-phenolic complexes, particularly as the concentration of phenolic compounds increased.

Contrary to what was observed in our study, Francesco *et al.* (2018) [38] reported that beer samples enriched with phenolic extracts showed better stability in terms of turbidity, color formation, and foam quality. In relation to the foam quality, the authors mention that the presence of tannins in the phenolic extracts that were added in the studied beers is responsible for foam stability. According to these authors, some tannins present in the phenolic extracts demonstrate a protective effect against foam collapse. Mazengia *et al.* (2021) [39] reported that adding *Moringa stenopetala* (LEMS) leaf extract contributed to foam stability and attributed this phenomenon to the presence of foam-promoting agents (polypeptides and iso- $\alpha$ -acids) and a deficit of foam-negative materials (lipid-binding proteins).

Coliforms are commonly used to indicate the sanitary quality of beer. As it can be seen in Table 3, no coliforms at 35 °C was detected in the samples, which indicates their microbiological quality.

**Table 1.**

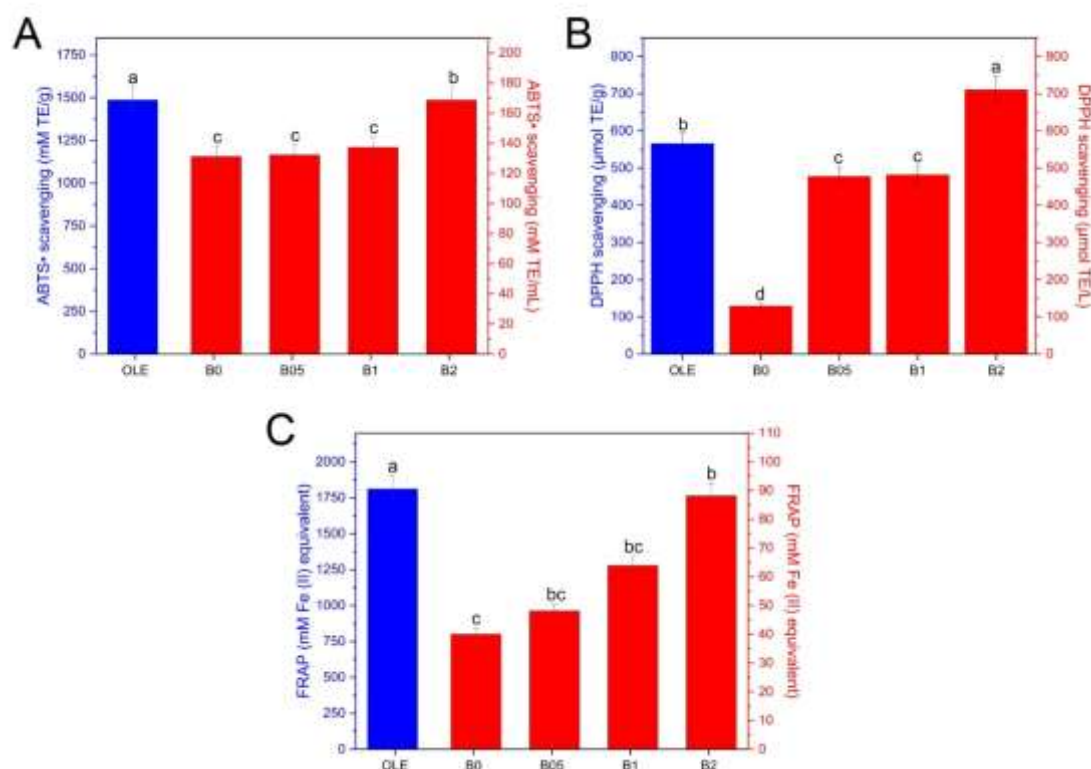
Beer samples' physicochemical profile and microbiological quality.

Physicochemical parameters	Beer samples			
	B0	B05	B1	B2
Alcohol content (% v/v)	1.4 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>
Calories (Kcal/100mL)	15.0 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>	14.0 <sup>a</sup>	15.0 <sup>a</sup>
Apparent extract (°P)	1.2 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>
Real extract (°P)	1.8 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>
Original extract (°P)	3.7 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	3.6 <sup>a</sup>	3.7 <sup>ca</sup>
Bitterness (IBU)	22.5 <sup>a</sup>	23.25 <sup>a</sup>	21.0 <sup>a</sup>	19.0 <sup>a</sup>
Original gravity - OG (g/cm <sup>3</sup> )	1.013 <sup>a</sup>	1.013 <sup>a</sup>	1.013 <sup>a</sup>	1.013 <sup>a</sup>
Final gravity – FG (g/cm <sup>3</sup> )	1.005 <sup>a</sup>	1.005 <sup>a</sup>	1.005 <sup>a</sup>	1.005 <sup>a</sup>
Color (EBC)	9.0 <sup>c</sup>	9.0 <sup>c</sup>	15.0 <sup>b</sup>	17.0 <sup>a</sup>
Volatile acidity (mEq/L)	12.0 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>	12.0 <sup>a</sup>
pH	5.0 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>	4.9 <sup>a</sup>	4.9 <sup>a</sup>
Foam reduction (%)	37.5 <sup>b</sup>	33.3 <sup>b</sup>	33.3 <sup>b</sup>	67.0 <sup>a</sup>
Coliforms at 35 °C (MPN/mL)*	nd <sup>#</sup>	nd <sup>#</sup>	nd <sup>#</sup>	nd <sup>#</sup>

\*Most Probable Number/mL. B0: Control beer - no added extract. B05: 0.5% extract. B1: 1.0% extract. B2: 2.0% extract. #Not detected. Different letters on the same line indicate a significant difference at the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Antioxidant potential, phenolic and polyphenolic compounds

Fig. 2 shows the ABTS<sup>•</sup> and DPPH radicals scavenging potential and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) of *Olea europaea* L. extract samples and extract-enriched beers.



**Fig. 2.** ABTS• (A) and DPPH (B) radicals scavenging potential and ferric ion reducing antioxidant power (C) (FRAP). OLE: *Olea europaea* L. extract. B0: Control beer - no added extract. B05: 0.5% extract. B1: 1.0% extract. B2: 2.0% extract.

The olive leaves extract showed appreciable antioxidant activity (Fig. 2.), with a high capacity to eliminate ABTS• (1482.2 mM Trolox equivalent/g) and DPPH (566.3 µM Trolox equivalent/g) radicals, as well as a capacity to reduce ferric ion (1812.0 mM Fe (II) equivalent). Similarly, regarding what was found in our study, Ribas *et al.* (2023) [40] reported that leaves extracts of different olive tree cultivars, especially the Manzanilla variety (radical scavenging: 93.56% DPPH and 78.15% ABTS), have a high potential of eliminating ABTS• and DPPH radicals. These authors also reported that olive leaf extracts were rich in phenolics, ranging from 13.27 to 22.81 mg GAE/g. This study found higher contents of total phenolics (135.4 mg GAE/g) (Table 2), as well as high contents of polyphenols (1016.8 mg/100 mL).

Lins *et al.* (2018) [41] found similar values of total phenolics (131.7 mg GAE/g, see Table 2) and oleuropein content (25.5 mg/g, see Table 3) in olive leaves extract that was obtained by solid-liquid extraction by using methanol/water (80:20, v/v) as a solvent.

Olive leaves have a rich variety of phenolic compounds, including simple phenols, flavonoids (flavones, flavanones, flavonols, and 3-flavonoids), and secoiridoids [40]. Phenolic compounds and polyphenols are responsible for the antioxidant capacity of different plant extracts [42]. We can observe that the natural antioxidant compounds of the olive leaves extract were transferred to the beer (Table 2), which was reflected in the antioxidant potential of the samples, mainly when the highest concentration of extract (2%) was used in the formulation (formulation B2) (Fig. 2.). The main objective of adding olive leaf extract to beer was to increase the antioxidant capacity of beer and enrich it with bioactive compounds, which will contribute to beer quality and increase the stability of the product to oxidative changes. Furthermore, it can have beneficial effects on consumer health.

**Table 2.**

Phenolic and polyphenols content in *Olea europaea* L. extract and beer samples.

Evaluated parameter	OLE*	B0	B05	B1	B2
	mg GAE/g	mg GAE/mL			
Total phenolics	135.4	171,09 <sup>d</sup>	234.53 <sup>c</sup>	317.6 <sup>b</sup>	437.4 <sup>a</sup>
Total polyphenols (mg/100mL)	1016,8 <sup>e</sup>	221.4 <sup>d</sup>	341.9 <sup>c</sup>	618.3 <sup>b</sup>	729.0 <sup>a</sup>

OLE: *Olea europaea* L. extract. B0: Control beer - no added extract. B05: 0.5% extract. B1: 1.0% extract. B2: 2.0% extract. GAE: Galic Acid Equivalent. Different letters on the same line indicate a significant difference at the 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

The chromatographic analysis (HPLC-DAD) of the olive leaves extract (Table 3) revealed the presence of phenolic compounds, including chlorogenic acid, epicatechin, caffeic acid, and coumaric acid. The identification and quantification of these compounds were obtained by comparing their retention times and spectra with those of authentic standards. Additionally, the characteristic absorption profile at 280nm confirmed the presence of oleuropein, a predominant phenolic compound in olive leaves. The extract that we obtained from olive leaves was notably rich in

oleuropein, which is consistent with previous studies that highlight the high concentration of this compound in olive plant parts [43,44].

Three different extract concentrations were added to different batches of beer to investigate the impact that olive leaves extract has on beer. Our analysis focused on changes in the concentrations of the identified phenolic compounds, with particular attention to oleuropein, the major component. Thus, by adding olive leaves extract to beer, we observed significant variations in the concentration of certain phenolic compounds similar to those that were described by Guglielmotti *et al.* (2020) [45]. The concentration of coumaric and cinnamic phenolic acids increased in beers after adding the extract. Notably, the concentration of oleuropein showed substantial changes, indicating that adding the extract mainly influenced the concentration of this compound in the beer. This finding suggests that oleuropein strongly contributed to the observed variations in total phenolics concentration in the beer samples.

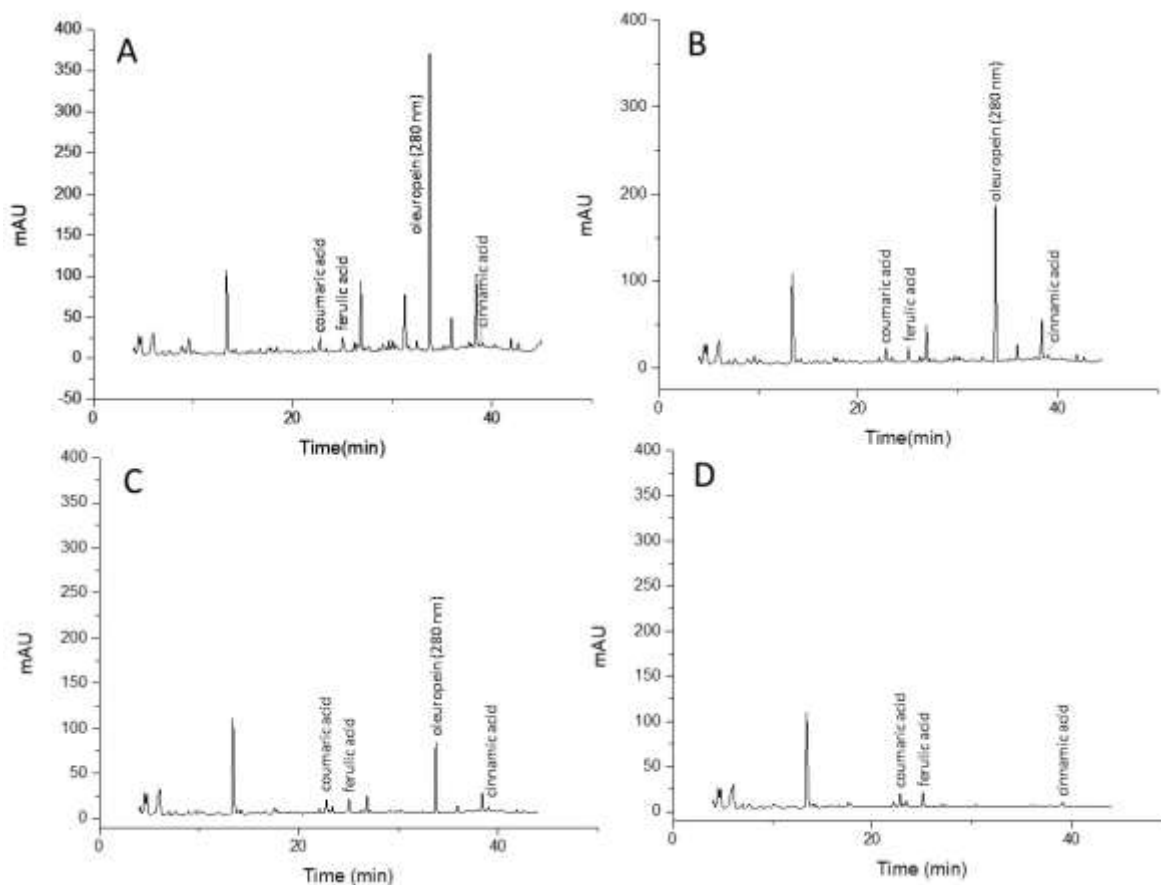
In addition to oleuropein glycoside, other phenolic compounds such as 3-hydroxytyrosol (which derives from oleuropein hydrolysis), luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, and verbascoside are found in olive leaves, which contribute to increased antioxidant capacity and shelf-life [45]. The increased concentration of phenolic compounds in a beer can contribute to the bitterness, aroma, and flavor of the drink, therefore potentially influencing the acceptance of the product. Further descriptive sensory analysis and hedonic tests are needed to confirm the perceptible effects on the beer's organoleptic Properties.

**Table 3.**

Phenolic compounds detected by HPLC-DAD.

Phenolic compound	RT (min)	Wavelength (nm)	Concentration ( $\mu\text{g}/500\text{ mL}$ )				Concentration (mg/g)
			B0	B05	B1	B2	Extract
Coumaric acid	22.7	309	359.2	346.0	412.0	478.1	0.14
Ferulic acid	25.0	322	400.2	369.4	431.0	462.0	<LD
Cinnamic acid	39.0	276	72.3	72.3	109.6	124.5	<LD
Chlorogenic acid	-	-	<LD	<LD	<LD	<LD	0.38
Caffeic acid	-	-	<LD	<LD	<LD	<LD	0.03
Epicatechin	-	-	<LD	<LD	<LD	<LD	1.21
Concentration (% Area)							
Oleuropein	33.7	280	<LD	5.7	11.2	17.4	26.1

<LD: Value below detection limit. B0: Control beer - no added extract. B05: 0.5% extract. B1: 1.0% extract. B2: 2.0% extract.



**Fig. 3.** Chromatograms of beer's samples obtained from 280 nm. (A) Beer with 2% of extract; (B) Beer with 1% of extract; (C) Beer with 0.5% of extract; (D) Beer 0% of extract.

#### 4. Conclusions

The non-enzymatic cold mashing technique associated with interrupted fermentation proved to be effective in obtaining a light beer with low-alcohol content. A soft, low-calorie beer with relatively reduced bitterness was obtained. *Olea europaea* L. extract was rich in phenolic compounds and polyphenols, especially oleuropein. Adding *Olea europaea* L. extract enriched the beer with bioactive compounds and potentiated its antioxidant activity, mainly when higher extract concentrations were used. Concentrations of 0.5% and 1% extract did not influence the quality of the beer foam, but when 2% extract was added, the beverage foam's

stability was reduced. The addition of the extract contributed to the enhancement of the EBC color of the beer, and the produced beer can be considered innovative and could arouse consumers' interest in unique craft beers and low-alcohol beverages.

### **Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process**

Not applicable.

### **Author contributions**

- Study conception and design: E Cappelin, DH Hendges, MAA Cunha.
- Data collection: E Cappelin, MLK Marchioro, D Meneguzzi.
- Analysis and interpretation of results: MLM Daltoé, TLC Oldoni, MAA Cunha.
- Draft manuscript preparation: E Cappelin, MAA Cunha.
- Revision of the results and approved the final version of the manuscript: MAA Cunha.

### **Conflict of interest**

There are no conflicts to declare.

### **Data availability**

Data will be made available on request.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge Fundação Araucária (Convênio 282/2022 - NAPI SUDOESTE 3793-1 13539-9) and the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Brazil. The authors thank the Multiuser Analysis Center of the Federal University of Technology – Paraná (Campus Pato Branco) for the provided analytical support. The authors mention and thank Bellibber Cervejaria (Salgado Filho - PR) for helping us to produce beer samples on a pilot scale.

## References

- [1] CERVBASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja 2023. [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/).
- [2] Dzedziński M, Stachowiak B, Kobus-Cisowska J, Kozłowski R, Stuper-Szablewska K, Szambelan K, *et al.* Supplementation of beer with *Pinus sylvestris* L. shoots extracts and its effect on fermentation, phenolic content, antioxidant activity and sensory profiles. *Electron J Biotechnol* 2023;63:10–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2023.01.001>.
- [3] Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Vendas de cerveja crescem 7,7% em 2021 2023. <https://www.sindicerv.com.br/noticias/vendas-de-cerveja-crescem-77-em-2021/>.
- [4] Research and Markets. Non-alcoholic beer global market report 2023 2023. <https://www.researchandmarkets.com/report/low-alcohol-beer> (accessed November 3, 2023).
- [5] Grover N, Nehra M, Gahlawat SK. Non alcoholic beers: Review and methods. *Madridge J Food Technol* 2022;7:200–6. <https://doi.org/10.18689/mjft-1000130>.
- [6] Salanță, L. C; Coldea, T.E; Ignat, M. V; Pop, C. R; Tofană, M; Mudura, E; *et al.*, Non-alcoholic and craft beer production and challenges. *Processes* 2020;8:1382. <https://doi.org/10.3390/pr8111382>.
- [7] Muller C, Neves LE, Gomes L, Guimarães M, Ghesti G. Processes for alcohol-free beer production: A review. *Food Sci Technol* 2020;40:273–81. <https://doi.org/10.1590/fst.32318>.
- [8] Mapa. Instrução Normativa No 65, de 10 de Dezembro de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brazil: 2021.
- [9] Dalberto G, da Rosa MR, Niemes JP, Leite K, Kutkoski RF, da Rosa EA. cold mash in brewing process: Optimization of innovative method for low-alcohol beer production. *ACS Food Sci Technol* 2021;1:374–81. <https://doi.org/10.1021/acfoodscitech.0c00099>.
- [10] Schöttke N, Rögner F. Cold mashing - Analysis and optimization of extraction processes at low temperatures in the brewing process. *E3S Web Conf* 2021;247:01036. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124701036>.
- [11] Iorizzo M, Coppola F, Letizia F, Testa B, Sorrentino E. Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. *Processes* 2021;9:839. <https://doi.org/10.3390/pr9050839>.
- [12] Palomino-Vasco M, Rodríguez-Cáceres MI, Mora-Díez N. Discrimination based on commercial/craft origin and on lager/ale fermentation of undiluted Spanish beer samples: front-face excitation-emission matrices and chemometrics. *J Food Compos Anal* 2023;115:104946. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104946>.
- [13] Strong G, England K. 2021 Style Guidelines. Beer Style Guidelines. Beer Judge Certif Progr - 2021 Style Guidel 2021:1–102. [file:///C:/Users/55469/Downloads/2021\\_Guidelines\\_Beer \(1\).pdf](file:///C:/Users/55469/Downloads/2021_Guidelines_Beer%20(1).pdf).
- [14] Costa P. M. C. da, Almeida I. L. M. L. de, Bianchini A, Bianchini M das GA, Vassoler E Silva RE, Rossignoli PA. Blond Ale craft beer production with addition of pineapple pulp. *J Exp Agric Int* 2019;38:1–5.



- <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v38i230294>.
- [15] Ambra R, Pastore G, Lucchetti S. The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. *Molecules* 2021;26:1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules26020486>.
- [16] Bertan FAB, da Silva Pereira Ronning E, Marchioro MLK, Oldoni TLC, Dekker RFH, da Cunha MAA. Valorization of pineapple processing residues through acetification to produce specialty vinegars enriched with red-Jambo extract of *Syzygium malaccense* leaf. *Sci Rep* 2022;12:19384. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23968-2>.
- [17] González E, Gómez-Caravaca AM, Giménez B, Cebrián R, Maqueda M, Martínez-Férez A, *et al.* Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2019;279:40–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.127>.
- [18] Ciont C, Difonzo G, Pasqualone A, Chis MS, Ranga F, Szabo K, *et al.* Phenolic profile of micro- and nano-encapsulated olive leaf extract in biscuits during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2023;428:136778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136778>.
- [19] Alrugaibah M, Yagiz Y, Gu L. Novel natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract phenolic compounds from olive leaves and predictive modelling by artificial neural networking. *Food Bioprod Process* 2023;138:198–208. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.02.006>.
- [20] Acar-Tek N, Ağagündüz D. Olive leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential effects on glycemia and lipidemia. *Ann Nutr Metab* 2020;76:10–5. <https://doi.org/10.1159/000505508>.
- [21] Menezes RCR, Peres KK, Costa-Valle MT, Faccioli LS, Dallegrave E, Garavaglia J, *et al.* Oral administration of oleuropein and olive leaf extract has cardioprotective effects in rodents: A systematic review. *Rev Port Cardiol* 2022;41:167–75. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2021.05.011>.
- [22] ASBC. Beer methods. *Am Soc Brew Chem* 2023. <https://www.asbcnet.org/Methods/BeerMethods/Pages/default.aspx>.
- [23] Kanauchi M, Kultgen E, Bamforth C. Low-molecular-weight materials from heavily roasted barley and malt with strong foam-stabilising potential. *J Inst Brew* 2019;125:39–46. <https://doi.org/10.1002/jib.538>.
- [24] Brasil. Instrução Normativa N 62, de 26 de Agosto de 2003. Brazil: 2003.
- [25] Oliveira CT, Maia BHLNS, Ferriani AP, Santos VAQ, Cunha MAA, Dias TS. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial potential of essential oil from the leaves of *Baccharis oreophila* Malme. *Chem Biodivers* 2019;16:e1800372. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800372>.
- [26] Oldoni TLC, Santos S, Mitterer-Daltoé ML, Pizone LHI, Lima VA. *Moringa oleifera* leaves from Brazil: Influence of seasonality, regrowth age and, region in biochemical markers and antioxidant potential. *Arab J Chem* 2022;15:104206. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104206>.
- [27] Antonelo FA, Rodrigues MS, Cruz LC, Pagnoncelli MG, Cunha MAA, Bonatto SJR, *et al.* Bioactive compounds derived from Brazilian Myrtaceae species: Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. *Biocatal Agric Biotechnol* 2023;48:102629.

- <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102629>.
- [28] Singleton, VL.; Orthofer R, Lamuela RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999;299:152–78.
- [29] European Brewery Convention. *Analytica-Microbiologica-EBC*. 2 sd. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl; 2005.
- [30] Iurckevicz G, Dahmer D, Santos VAQ, Vetvicka V, Barbosa-Dekker AM, Dekker RFH, *et al.* Encapsulated microparticles of (1→6)-β-D-Glucan containing extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and characterization. *Molecules* 2019;24. <https://doi.org/10.3390/molecules24112099>.
- [31] Kobayashi M, Nagahisa K, Shimizu H, Shioya S. Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:549–58. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0516-1>.
- [32] Alves MM, Rosa MS, Santos PPA, Paz MF, Morato PN, Fuzinato MM. Artisanal beer production and evaluation adding rice flakes and soursop pulp (*Annona muricata* L.). *Food Sci Technol* 2020;40:545–9. <https://doi.org/10.1590/fst.36119>.
- [33] Klimczak K, Cioch-Skoneczny M. Changes in beer bitterness level during the beer production process. *Eur Food Res Technol* 2023;249:13–22. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04154-0>.
- [34] Zhang Y, Jia S, Zhang W. Predicting acetic acid content in the final beer using neural networks and support vector machine. *J Inst Brew* 2012;118:361–7. <https://doi.org/10.1002/jib.50>.
- [35] Guglielmotti M, Passaghe P, Buiatti S. Use of olive (*Olea europaea* L.) leaves as beer ingredient, and their influence on beer chemical composition and antioxidant activity. *J Food Sci* 2020;85:2278–85. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15318>.
- [36] Zenit R, Rodríguez-Rodríguez J. The fluid mechanics of bubbly drinks. *Phys Today* 2018;71:44–50. <https://doi.org/10.1063/PT.3.4069>.
- [37] Aliyari MA, Motahar SFS, Salami M, Betti M, Hosseini E, Habibi-Kelishomi Z, *et al.* Structural, functional, and anti-cancer properties of conjugates of quinoa protein isolate and olive leaf polyphenolic extract: Application in production of bread. *Food Struct* 2022;33:100292. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100292>.
- [38] Francesco G, Bravi E, Sanarica E, Marconi O, Cappelletti F, Perretti G. Effect of addition of different phenolic-rich extracts on beer flavour stability. *Foods* 2020;9:1638. <https://doi.org/10.3390/foods9111638>.
- [39] Mazengia G, Dessalegn E, Dessalegn T. Effect of *Moringa stenopetala* leaf extracts on the physicochemical characteristics and sensory properties of lagered beer. *Food Sci Nutr* 2022;10:507–14. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2672>.
- [40] Ribas JCR, Lazzari A, Gonzalez LBF, Silva CM da, Adamuchio LG, Cuquel FL, *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of leaves from olive trees grown in Paraná, Brazil. *Pesqui Agropecuária Bras* 2023;58. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2023.v58.03025>.

- [41] Lins PG, Marina Piccoli Pugine S, Scatolini AM, de Melo MP. *In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon* 2018;4:e00805. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805>.
- [42] Savi A, Calegari MA, Calegari GC, Santos VAQ, Wermuth D, Cunha MAA, *et al.* Bioactive compounds from *Syzygium malaccense* leaves: Optimization of the extraction process, biological and chemical characterization. *Acta Sci Technol* 2020;42:e46773. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.46773>.
- [43] Chigurupati S, Alharbi FS, Almahmoud S, Aldubayan M, Almoshari Y, Vijayabalan S, *et al.* Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Olea europaea* L. Ethanolic leaves extract. *Arab J Chem* 2021;14:103422. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103422>.
- [44] Romero-Márquez JM, Navarro-Hortal MD, Jiménez-Trigo V, Vera-Ramírez L, Forbes-Hernández TJ, Esteban-Muñoz A, *et al.* An oleuropein rich-olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces  $\beta$ -amyloid and tau proteotoxicity through regulation of oxidative- and heat shock-stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem Toxicol* 2022;162:112914. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112914>.
- [45] Guglielmotti M, Passaghe P, Buiatti S. Use of olive (*Olea europaea* L.) leaves as beer ingredient, and their influence on beer chemical composition and antioxidant activity. *J Food Sci* 2020;85:2278–85. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15318>.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica de *cold mashing* associada à fermentação interrompida, permitiu a produção de cervejas leves com baixo teor alcoólico. O *cold mashing* e a fermentação interrompida são métodos relativamente fáceis de implementar em cervejarias e podem ser usados para produzir cervejas de qualidade profissional. As cervejas produzidas apresentaram baixo teor calórico, sendo caracterizadas como bebida light e exibiram um amargor relativamente baixo. O extrato de folhas de oliveira revelou a presença de compostos fenólicos, incluindo ácido clorogênico, epicatequina, ácido caféico, ácido cumárico e aleuropeína, que foi o composto majoritário no extrato. A inserção do extrato de *Olea europaea* L. na cerveja permitiu o enriquecimento com compostos bioativos e potencialização da atividade antioxidante da bebida. O extrato das folhas de oliveira também mostrou forte atividade antioxidante, com capacidade de eliminar os radicais livres ABTS• (1482,2 mM equivalente Trolox/g) e DPPH (566,3 µM Trolox equivalente/g), e de reduzir íons férricos (equivalente de Fe (II) 1812,0 mM). As concentrações de 0,5% e 1% de extrato não influenciaram a qualidade da espuma da cerveja, mas quando foi adicionado 2% de extrato, a estabilidade da espuma da bebida foi reduzida. A adição do extrato também contribuiu para realçar a cor da cerveja, sendo mais evidente na maior concentração. Já em relação ao amargor, a concentração do extrato na bebida não influenciou de forma estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) este parâmetro. As cervejas produzidas com o extrato de *Olea europaea* L. podem ser consideradas inovadoras, e poderia despertar o interesse dos consumidores de bebidas especiais, com baixo teor alcoólico e calórico, e potencialidades terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

ABAZA, L., BEN YOUSSEF, N., MANAI, H., *et al.* "Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities.", **Grasas y Aceites**, v. 62(1), p. 96– 104., 2011.

ACAR-TEK, N., AGAGUNDYZ, D. "Olive Leaf (*Olea europaea* L. folium): Potential Effects on Glycemia and Lipidemia", **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 10–15, 2020. DOI: 10.1159/000505508.

ADAMENKO, K., KAWA-RYGIELSKA, J., KUCHARSKA, A. Z. "Characteristics of Cornelian cherry sour non-alcoholic beers brewed with the special yeast *Saccharomyces ludwigii*", **Food Chemistry**, v. 312, p. 125968, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125968. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125968>.

AGRARIA-MALTE. "Saccharomyces ludwigii.", 2018. Disponível em: <https://www.agraria.com.br/malte/produtos/5/fermentos/10/bio4/271/saccharomyces-ludwigii>.

ALBUQUERQUE, B. B. "Beber cauim, lembrar e aprender entre os tupinambá do Brasil colonial", **teia**, v. 17, p. 45, 2016.

ALMEIDA, A. F. F. "Estudo da aplicação de diferentes culturas microbiológicas à produção de cerveja artesanal.", **Universidade do Minho - Escola de Engenharia**, 2017.

ALRUGAIBAH, M., YAGIZ, Y., GU, L. Novel natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract phenolic compounds from olive leaves and predictive modelling by artificial neural networking. **Food Bioprod Process** 2023;138:198–208. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.02.006>.

ALVES, M. de M., ROSA, M. da S., SANTOS, P. P. A. dos, *et al.* "Artisanal beer production and evaluation adding rice flakes and soursop pulp (*Annona muricata* L.)", **Food Science and Technology**, v. 40, n. suppl 2, p. 545–549, dez. 2020. DOI: 10.1590/fst.36119.

AMBRA, R., PASTORE, G., LUCHETTI, S. "The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health", **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 1–27, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020486.

ARUOMA, O. I. "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease.", **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75(2), p. 199–212, 1998.

ASBC. **Beer methods**. 2023. American Society of Brewing Chemists. Disponível em: <https://www.asbcnet.org/Methods/BeerMethods/Pages/default.aspx>.

BARGA, M., "Leveduras não-saccharomyces para produção de cerveja sem álcool.". **Engarrafador moderno**, [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: <https://engarrafadormoderno.com.br/ingredientes/leveduras-nao-saccharomyces-para-producao-de-cerveja-sem-alcool>.

BARRETO, R. A. "Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do kettle sour em mosto cervejeiro.", **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, 2022.

BATISTA, R. D. A. "Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja com Pinhão (*Araucaria angustifolia*)", **Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena Raquel**, p. 1–108, 2014.

BENZIE, I. F. ., STRAIN, J. J. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.", **Analytical biochemistry.**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRASIL. "Instrução Normativa N 62, De 26 De Agosto De 2003.", **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2003.

BRASIL. "INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 65, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.", p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>.

BURDA, S. ., OLESZEK, W. "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids.", **Agric. Food. Chem.**, v. 49(6), p. 2774–2779, 2001.

CASTRO-SEPULVED, M., JOHANNSEN, N., ASTUDILLO, S., *et al.* "Effects of beer, non-alcoholic beer and water consumption before exercise on fluid and electrolyte homeostasis in athletes", **Nutrients**, v. 8, n. 6, 2016. DOI: 10.3390/nu8060345.

CATARINO, M., MENDES, A. "Non-alcoholic beer - A new industrial process", **Separation and Purification Technology**, v. 79, n. 3, p. 342–351, 2011. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.03.020.

CERVBRASIL. **ASSOCIAÇÃO CERVEJEIRA DA INDUSTRIA DA CERVEJA - DADOS DO SETOR CERVEJEIRO NACIONAL.** . [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/http-www-cervbrasil-org-br-novo\\_site-wp-content/uploads-2021-04-anuariocerveja2-pdf/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/http-www-cervbrasil-org-br-novo_site-wp-content/uploads-2021-04-anuariocerveja2-pdf/).

CHIGURUPATI, S., ALHARBI, F. S., ALMAHMOUD, S., *et al.* "Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Olea europaea* L. Ethanolic leaves extract", **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 103422, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103422.

CIONT, C., DIFONZO, G., PASQUALONE, A., CHIS, M. S., RANGA, F., SZABO, K., *et al.* Phenolic profile of micro- and nano-encapsulated olive leaf extract in biscuits during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chem** 2023;428:136778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136778>.

COSTA, P. M. C. DA, ALMEIDA, I. L. M. L. DE, BIANCHINI, A., *et al.* "Blond Ale Craft Beer Production with Addition of Pineapple Pulp", **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 38, n. 2, p. 1–5, 2019. DOI: 10.9734/jeai/2019/v38i230294.

COSTA, V. L. L., HATA, N. N. Y., RESSUTTE, J. B., *et al.* "Produção de cerveja artesanal com uso de levedura *Brettanomyces bruxellensis*.", **I Simpósio Brasileiro de Bebidas Fermentadas e Destiladas.**, 2021.

DALBERTO, G., DA ROSA, M. R., NIEMES, J. P., *et al.* "Cold Mash in Brewing Process: Optimization of Innovative Method for Low-Alcohol Beer Production", **ACS Food Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 374–381, 2021. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.0c00099.

DAMEROW, P. "Sumerian Beer: The Origins of Brewing Technology in Ancient Mesopotamia.", **Cuneiform Digital Library Journal**, v. 2, 2012.

EL, S. N. ., KARAKAYA, S. "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial.", **Effects on human health. Nutrition Reviews.**, v. v. 67, n., p. 632–638, 2009.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. *Analytica-Microbiologica-EBC*. 2<sup>nd</sup> ed. Nürnberg, Fachverlag Hans Carl, 2005.

FRANCESCO, G. De, TURCHETTI, B., SILEONI, V., *et al.* "Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer", **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 113–121, 2015. DOI: 10.1002/jib.185.

FREIRE, B. R., LEMES, D. S., MORAES, A. S. da S., *et al.* "Revista Agrarian", **Revista Agrarian**, v. 13, p. 280–287, 2020.

GE, X., JING, L., ZHAO, K., *et al.* "The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color.", **Food Chemistry**, p. 127–655, 2020.

GIANNAKOU, K., VISIONONI, F., ZHANG, P., *et al.* "Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations", **Food Microbiology**, v. 100, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103838. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103838>.

GIORGI, V. V., JÚNIOR, J. O. C. "A produção cervejeira como patrimônio intangível. *Cultura Histórica e Patrimônio.*", v. 3-nº2, 2016.

GONZÁLEZ, E., GÓMEZ-CARAVACA, AM., GIMÉNEZ, B., CEBRIÁN, R.,

MAQUEDA, M., MARTÍNEZ-FÉREZ, A., *et al.* Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chem** 2019;279:40–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.127>.

GUIMARÃES, B. P. "Avaliação do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Distrito Federal para uso cervejeiro.", **Dissertação de mestrado da Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química**, p. 1–6, 2021.

HU, S., DENG, H., LIU, R., *et al.* "Molecular brewing: The molecular structural effects of starch adjuncts on barley malt brewing performances. **International Journal of Biological Macromolecules**.", v. 193, p. 661- 671., 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. "1ª Edição Digital", **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, p. 1020, 2008.

IURCKEVICZ, G., DAHMER, D., SANTOS, V. A. Q., *et al.* "Encapsulated Microparticles of (1→6)-β-d-Glucan Containing Extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and characterization", **Molecules**, v. 24, n. 11, 2019. DOI: 10.3390/molecules24112099.

JORGE, N. ., LUZIA, D. M. . "Química Nova", v. 32, p. 946, 2009.

KAPP, G. R., BAMFORTH, C. W. "The foaming properties of proteins isolated from barley", **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 11, p. 1276–1281, 2002. DOI: 10.1002/jsfa.1177.

KLIMCZAK, K., CIOCH-SKONECZNY, M. "Changes in beer bitterness level during the beer production process", **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 1, p. 13–22, jan. 2023. DOI: 10.1007/s00217-022-04154-0.

KOBAYASHI, M., NAGAHISA, K., SHIMIZU, H., *et al.* "Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 549–558, nov. 2006. DOI: 10.1007/s00253-006-0516-1.

LARROQUE, M. N., CARRAU, F., FARIÑA, L., *et al.* "Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds", **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108953, 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953>.

LARSSON, M., SVENSSON, A., APEL, J. "Botanical evidence of malt for beer production in fifth–seventh century Uppåkra, Sweden.", **Archaeological and Anthropological Sciences**., p. 1961–1972, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12520-018-0642-6>.

LEE, O. H., LEE, B. Y. "Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract.", **Bioresour Technol.**, 2010.



LORIZZO, M., COPPOLA, F., LETIZIA, F., TESTA, B., SORRENTINO, E; Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. **Processes** 2021;9:839. <https://doi.org/10.3390/pr9050839>.

M. M. BONACCORS. "Guia de estilos de Cervejas - Bjcp 2015", **Certification Beer Judge Program (BJCP)**, p. 1–178, 2018.

MACHADO, W. de A. C., SARNIGHAUSEN, V. C. R., DAL PAI, A., *et al.* "Avaliação do efeito bacteriostático das folhas do lúpulo para tratamento de dejetos bovinos", **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 5, p. 140–148, 2020. DOI: 10.6008/cbpc2179-6858.2020.005.0015.

MAPA. "INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 65, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.", p. 1–8, 2021.

MEDEIROS, D. A. M., PINTO, T. V., TOMÉ, P. H. F., *et al.* "Composição e propriedades bioquímicas da cerveja artesanal ale de flor de hibiscos enriquecida com frutos de mirtilo", **Tecnóloga de Alimentos - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM) -Uberlândia, MG, Brasil.**, p. 1–19, 2020.

MEDEIROS, M. B., AIZEMBERG, R., SILVA, T. A. O., *et al.* **Microbiologia Industrial Alimentos - Produção de cerveja**. 1 edição ed. Rio de Janeiro, [s.n.], 2018.

MENEZES, R. camara R., PERES, K. K., COSTA-VALLE, M. T., *et al.* "Oral administration of oleuropein and olive leaf extract has cardioprotective effects in rodents: A systematic review", **Portuguese society of cardiology**, v. 41, p. 167–175, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repc.2021.05.011>.

MEUSSDOERFFER, F. G. "Comprehensive History of Beer Brewing. Handbook of Brewing.", p. 1–42, 2009.

MONTANARI, L., MARCONI, O., MAYER, H., *et al.* "Production of Alcohol-Free Beer", **Beer in Health and Disease Prevention**, 2009.

MORADO, R. "Larousse da Cerveja-São Paulo", p. 1–28, 2009.

MURPHY, E. A., DAVIS, J. M., CARMICHAEL, M. D. "Immune modulating effects of  $\beta$ -glucan. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.**", v. 13(6), p. 656–661, 2010.

OLIVEIRA, V. da G. **Processos Biotecnológicos Industriais - Produção de Bens de Consumo com Uso de Fungos e Bactérias**. 1ª Edição ed. São Paulo, [s.n.], 2015.

OSORIO-PAZ, I., BRUNAUER, R., ALAVEZ, S. "Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease", **Food Research International**, v. 79, n. October 2021, p. 1299–1313, 2019. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.03.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.067>.

POHL-VALERO, S. "The Scientific Lives of Chicha. Osiris.", v. 35, p. 204– 227., 2020. DOI: 10.1086/709127.

PORT, S. A. "CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE CERVEJA TIPO LAMBIC.", **Universidade Federal Da Fronteira Sul**, 2017. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/4496>.

RANI, H; BHARDWAJ, R. D., Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer", **Concise Reviews & Hypotheses In Food Science**, v. 86, p. 3322-3340., 2021. DOI:10.1111/1750-3841.15858

RE, R. ., PELLEGRINI, N. ., PROTEGGENTE, A. ., *et al.* "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.", **Free Radical Biology & Medicine, New York**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REBELLO, F. D. F. P. "Produção de cerveja", **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, p. 145–155, 2009. DOI: 10.18406/2316-1817v1n32009224.

RIBAS, J. C. R., LAZZARI, A., GONZALEZ, L. B. F., *et al.* "Bioactive compounds and antioxidant activity of leaves from olive trees grown in Paraná, Brazil", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 58, 2023. DOI: 10.1590/s1678-3921.pab2023.v58.03025.

RIESENHUBER, A. ., BOEHM, M. ., POSCH, M. ., *et al.* "Diuretic potential of energy drinks. Amino acids", v. 1(1), p. 81–83, 2006.

ROSA, N. A., AFONSO, J. C. "A Química da Cerveja", **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 2, p. 98–105, 2015. DOI: 10.5935/0104-8899.20150030.

SALIMBENI, J. F., MENEGUETTI, M. P. D. R. R. D., ROLIM, T. F. "**Caracterização da água e sua influência sensorial para produção de cerveja artesanal**", p. 59, 2016. Disponível em: <http://lyceumononline.usf.edu.br/salavirtual/documentos/2862.pdf>.

SAVI, A., CALEGARI, M. A., CALEGARI, G. C., *et al.* "Bioactive compounds from syzygium malaccense leaves: Optimization of the extraction process, biological and chemical characterization", **Acta Scientiarum - Technology**, v. 42, n. 1, 2020. DOI: 10.4025/actascitechnol.v42i1.46773.

SILVA, L. D. O. **Laboratório na sala de aula - guia**. [S.l: s.n.], 2019.

SIMPSON, R. J. ., KUNZ, H. ., AGHA, N. ., *et al.* "Exercise and the Regulation of Immune Functions.", **Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise.**, p. 355–380, 2015.

SINDICERV. "SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA - VENDAS DE CERVEJA 2021.", 2022. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/noticias/vendas-de-cerveja-crescem-77-em-2021/>.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R. ., LAMUELA, R. M. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu

reagent.", **Methods in Enzymology.**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOUSA, V. M., FOGAÇA, L. C. S. "Perfil Físico-Químico de Cervejas Artesanais e Industriais e Adequação dos Rótulos Quanto à sua Graduação Alcoólica", **ID on line revista de psicologia**, v. 13, n. 43, p. 440–447, 2019. DOI: 10.14295/online.v13i43.1546.

STANDAGE, T. "História do Mundo em 6 copos - Rio de Janeiro", **ZAHAR**, p. 1–9, 2005.

TOLEDO, A. L.; SILVEIRA P. M; CAPUCI, A. P. S. "Produção de cerveja artesanal", **II encontro de desenvolvimento de percessos agroindustriais UNIUBE - Uberaba**, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://cervejasartesanais.wordpress.com/producao-de-cerveja-artesanal/>.

TOROK, Á., SZERLETICS, Á., JANTYIK, L. "Factors Influencing Competitiveness in the Global Beer Trade", **Sustainability - Department of Agricultural Economics and Rural Development, Corvinus University of Budapest**, v. 12, n. 15, p. 5957, 2020. DOI: 10.3390/su12155957.

UNGER, R. W. "Beer in the Middle Ages and the Renaissance.", **Philadelphia: University of Pennsylvania Press**, 2007.

VOLMAN, J. J., RAMAKERS, J. D., PLAT. "Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans -**Physiology & Behavior**," v. 94(2), p. 276–284, 2008.

WU, S. ., ZHENG, W. ., ZHANG, S.; YOU, G. ., *et al.* "Polymer", v. 188, p. 122–143, 2020.

YU, W. W., ZHAI, H. L., XIA, G. B., *et al.* "Starch fine molecular structures as a significant controller of the malting, mashing, and fermentation performance during beer production.", **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 296–307, 2020.

ZHANG, Y., JIA, S., ZHANG, W. "Predicting acetic acid content in the final beer using neural networks and support vector machine", **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 4, p. 361–367, dez. 2012. DOI: 10.1002/jib.50.

## ANEXOS

## 6.1 ANEXO 1

Tabela 3 - 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
1,00000	0,00	1,00605	1,55	1,01213	3,10
1,00020	0,05	1,00624	1,60	1,01233	3,15
1,00039	0,10	1,00644	1,65	1,01253	3,20
1,00059	0,15	1,00663	1,70	1,01273	3,25
1,00078	0,20	1,00683	1,75	1,01292	3,30
1,00098	0,25	1,00702	1,80	1,01312	3,35
1,00117	0,30	1,00722	1,85	1,01332	3,40
1,00137	0,35	1,00742	1,90	1,01352	3,45
1,00156	0,40	1,00761	1,95	1,01371	3,50
1,00176	0,45	1,00781	2,00	1,01391	3,55
1,00195	0,50	1,00799	2,05	1,01411	3,60
1,00214	0,55	1,00820	2,10	1,01431	3,65
1,00234	0,60	1,00840	2,15	1,00451	3,70
1,00254	0,65	1,00859	2,20	1,01471	3,75
1,00273	0,70	1,00879	2,25	1,01490	3,80
1,00293	0,75	1,00897	2,30	1,01510	3,85
1,00312	0,80	1,00918	2,35	1,01530	3,90
1,00332	0,85	1,00938	2,40	1,01550	3,95
1,00351	0,90	1,00957	2,45	1,01570	4,00
1,00371	0,95	1,00977	2,50	1,01590	4,05
1,00390	1,00	1,00997	2,55	1,01609	4,10
1,00410	1,05	1,01016	2,60	1,01629	4,15
1,00429	1,10	1,01036	2,65	1,01649	4,20
1,00449	1,15	1,01056	2,70	1,01669	4,25
1,00468	1,20	1,01075	2,75	1,01689	4,30
1,00488	1,25	1,01095	2,80	1,01709	4,35
1,00507	1,30	1,01115	2,85	1,01729	4,40
1,00527	1,35	1,01134	2,90	1,01749	4,45
1,00546	1,40	1,01154	2,95	1,01769	4,50
1,00566	1,45	1,01174	3,00	1,01789	4,55
1,00585	1,50	1,01194	3,05	1,01808	4,60

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
1,01828	4,65	1,02511	6,35	1,03201	8,05
1,01848	4,70	1,02531	6,40	1,03221	8,10
1,01868	4,75	1,02551	6,45	1,03242	8,15
1,01888	4,80	1,02571	6,50	1,03262	8,20
1,01908	4,85	1,02592	6,55	1,03263	8,25
1,01928	4,90	1,02612	6,60	1,03283	8,30
1,01948	4,95	1,02632	6,65	1,03324	8,35
1,01969	5,00	1,02652	6,70	1,03344	8,40
1,01988	5,05	1,02672	6,75	1,03365	8,45
1,02008	5,10	1,02693	6,80	1,03385	8,50
1,02028	5,15	1,02713	6,85	1,03406	8,55
1,02048	5,20	1,02733	6,90	1,03426	8,60
1,02068	5,25	1,02753	6,95	1,03447	8,65
1,02088	5,30	1,02774	7,00	1,03467	8,70
1,02108	5,35	1,02794	7,05	1,03488	8,75
1,02128	5,40	1,02814	7,10	1,03503	8,80
1,02148	5,45	1,02835	7,15	1,03529	8,85
1,02169	5,50	1,02855	7,20	1,03549	8,90
1,02189	5,55	1,02875	7,25	1,03570	8,95
1,02209	5,60	1,02896	7,30	1,03591	9,00
1,02229	5,65	1,02916	7,35	1,03611	9,05
1,02249	5,70	1,02936	7,40	1,03632	9,10
1,02269	5,75	1,02956	7,45	1,03652	9,15
1,02289	5,80	1,02977	7,50	1,03673	9,20
1,02309	5,85	1,02997	7,55	1,03693	9,25
1,02329	5,90	1,03018	7,60	1,03714	9,30
1,02349	5,95	1,03038	7,65	1,03735	9,35
1,02370	6,00	1,03058	7,70	1,03755	9,40
1,02390	6,05	1,03079	7,75	1,03776	9,45
1,02410	6,10	1,03099	7,80	1,03796	9,50
1,02430	6,15	1,03119	7,85	1,03817	9,55
1,02450	6,20	1,03140	7,90	1,03838	9,60
1,02470	6,25	1,03160	7,95	1,03858	9,65
1,02490	6,30	1,03181	8,00	1,03879	9,70

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
1,03909	9,75	1,03941	9,85	1,03982	9,95
1,03929	9,80	1,03962	9,90	1,04003	10,00

## 6.2 ANEXO 2

**Tabela 4 - Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%**

Número Positivos	de Tubos		NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
	0,1	0,01		0,001	Inferior
0	0	0	<3,0	-,-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	-,-

## 6.3 ANEXO 3

Figura 11 - Laudo das análises físico-química e microbiológicas das amostras



Rua Ottawa 384, Jardim Canadá, Nova Lima  
 contato@laboratorioidacerveja.com.br  
 CNPJ: 32.293.513/0001-24

RELATÓRIO DE ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS		
Amostra Cliente: American Blond Ale SEM extrato nº 0 Código Laboratório: 0404/2022		
DATA DA ANÁLISE: 26/10/2022 HORA: 09:00 (uso interno)		
ANÁLISE REALIZADA: Análises físico químicas de cerveja		
Responsável pela análise: Dr. Bruno Botelho (DQ-UFMG)		
IDENTIFICAÇÃO CLIENTE		
Nome: Vinhos Belli Ltda		
Contato: Eliziane Cappelin	Telefone: (46) 3564-1476	
CNPJ: 11.235.786/0001-42	E-mail: elizianecappelin@hotmail.com	
Endereço: Rua LINHA QUINTINO, SN - INTERIOR, Salgado Filho - PR, CEP: 85620000		
RESULTADOS		
Parâmetro	Método	Resultado
Teor álcool (% v/v)	ASBC Beer-4	1,4% v/v
Extrato aparente	ASBC Beer-3	1,2 °P
Extrato real	ASBC Beer-5	1,8 °P
Extrato Original	ASBC Beer-6	3,7 °P
Amargor	ASBC - 23	22,5 IBU
pH	ASBC Beer-9	5,0
Densidade (g/mL)	ASBC Beer-2	1,005
Cor (EBC)	ASBC Beer-10	9 EBC
Calorias (Kcal/100mL)	ASBC Beer - 33	15 Kcal/100mL
Acidez volátil	Determinação do teor de ácidos orgânicos voláteis através da técnica de volumetria de neutralização	12 mEq/L
Resultados apresentados são médias de três replicatas. Todas as análises apresentaram coeficiente de variação menores que 5%		
<p><b>Teor alcoólico (% de álcool v/v):</b> Determinação através de cromatografia gasosa, adaptado da metodologia oficial descrita pela ASBC (Beer - 4C). <b>Determinação dos extratos (original, real e aparente)</b> – Determinação através de densitometria, sendo os extratos real e aparente medidos experimentalmente e o extrato original estimado através de cálculos (ASBC 3, 5, 6). <b>Determinação do amargor (IBU):</b> Determinação do amargor da amostra através de um processo de extração líquido-líquido, que separa os iso-alfa ácidos da cerveja, e faz a quantificação dos mesmos utilizando um espectrofotômetro (adaptação ASBC 23) <b>Determinação do pH:</b> Determinação do pH da amostra utilizando um pHmetro de bancada, com precisão de 0,01 unidades, realizado segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-9). <b>Determinação da Densidade:</b> Determinação da densidade relativa utilizando um densímetro calibrado e metodologia oficial da ASBC (Beer -2). <b>Determinação da cor:</b> Determinação da cor da amostra utilizando um espectrofotômetro, segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-10). <b>Teor calórico (Kcal/100mL):</b> Determinação do teor calórico a partir das análises de extrato e teor alcoólico (ASBC 33).</p>		

Belo Horizonte, 11/11/ 2022

  
 Dra. Beatriz Borelli  
 CRBIO: 30.593/4-D  
 Diretora Científica





Rua Ottawa 384, Jardim Canadá, Nova Lima  
 contato@laboratoriodacerveja.com.br  
 CNPJ: 32.293.513/0001-24

RELATÓRIO DE ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS		
<b>Amostra Cliente:</b> American Blond Ale 0,5% extrato n° 5 Código Laboratório: 0405/2022		
<b>DATA DA ANÁLISE:</b> 26/10/2022		<b>HORA:</b> 09:00 <b>(uso interno)</b>
<b>ANÁLISE REALIZADA:</b> Análises físico químicas de cerveja		
<b>Responsável pela análise:</b> Dr. Bruno Botelho (DQ-UFMG)		
IDENTIFICAÇÃO CLIENTE		
<b>Nome:</b> Vinhos Belli Ltda		
<b>Contato:</b> Eliziane Cappelin		<b>Telefone:</b> (46) 3564-1476
<b>CNPJ:</b> 11.235.786/0001-42		<b>E-mail:</b> elizianecappelin@hotmail.com
<b>Endereço:</b> Rua LINHA QUINTINO, SN - INTERIOR, Salgado Filho - PR, CEP: 85620000		
RESULTADOS		
Parâmetro	Método	Resultado
Teor álcool (% v/v)	ASBC Beer-4	1,3% v/v
Extrato aparente	ASBC Beer-3	1,2 °P
Extrato real	ASBC Beer-5	1,6 °P
Extrato Original	ASBC Beer-6	2,8 °P
Amargor	ASBC - 23	23,25 IBU
pH	ASBC Beer-9	5,0
Densidade (g/mL)	ASBC Beer-2	1,005
Cor (EBC)	ASBC Beer-10	9 EBC
Calorias (Kcal/100mL)	ASBC Beer - 33	12 Kcal/100mL
Acidez volátil	Determinação do teor de ácidos orgânicos voláteis através da técnica de volumetria de neutralização	12 mEq/L
Resultados apresentados são médias de três replicatas. Todas as análises apresentaram coeficiente de variação menores que 5%		
<p><b>Teor alcoólico (% de álcool v/v):</b> Determinação através de cromatografia gasosa, adaptado da metodologia oficial descrita pela ASBC (Beer - 4C). <b>Determinação dos extratos (original, real e aparente)</b> – Determinação através de densitometria, sendo os extratos real e aparente medidos experimentalmente e o extrato original estimado através de cálculos (ASBC 3, 5, 6). <b>Determinação do amargor (IBU):</b> Determinação do amargor da amostra através de um processo de extração líquido-líquido, que separa os iso-alfa ácidos da cerveja, e faz a quantificação dos mesmos utilizando um espectrofotômetro (adaptação ASBC 23) <b>Determinação do pH:</b> Determinação do pH da amostra utilizando um pHmetro de bancada, com precisão de 0,01 unidades, realizado segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-9). <b>Determinação da Densidade:</b> Determinação da densidade relativa utilizando um densímetro calibrado e metodologia oficial da ASBC (Beer -2). <b>Determinação da cor:</b> Determinação da cor da amostra utilizando um espectrofotômetro, segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-10). <b>Teor calórico (Kcal/100mL):</b> Determinação do teor calórico a partir das análises de extrato e teor alcoólico (ASBC 33).</p>		

Belo Horizonte, 11/11/ 2022

  
 Dra. Beatriz Borelli  
 CRBIO: 30.593/4-D  
 Diretora Científica



Rua Ottawa 384, Jardim Canadá, Nova Lima  
 contato@laboratoriodacerveja.com.br  
 CNPJ: 32.293.513/0001-24

RELATÓRIO DE ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS		
<b>Amostra Cliente:</b> American Blond Ale 1% de extrato n° 1 <b>Código Laboratório:</b> 0402/2022		
<b>DATA DA ANÁLISE:</b> 26/10/2022 <b>HORA:</b> 09:00		<b>(uso interno)</b>
<b>ANÁLISE REALIZADA:</b> Análises físico químicas de cerveja		
<b>Responsável pela análise:</b> Dr. Bruno Botelho (DQ-UFMG)		
IDENTIFICAÇÃO CLIENTE		
<b>Nome:</b> Vinhos Belli Ltda		
<b>Contato:</b> Eliziane Cappelin		<b>Telefone:</b> (46) 3564-1476
<b>CNPJ:</b> 11.235.786/0001-42		<b>E-mail:</b> elizianecappelin@hotmail.com
<b>Endereço:</b> Rua LINHA QUINTINO, SN - INTERIOR, Salgado Filho - PR, CEP: 85620000		
RESULTADOS		
Parâmetro	Método	Resultado
Teor álcool (% v/v)	ASBC Beer-4	1,3% v/v
Extrato aparente	ASBC Beer-3	1,3 °P
Extrato real	ASBC Beer-5	1,8 °P
Extrato Original	ASBC Beer-6	3,6 °P
Amargor	ASBC - 23	21 IBU
pH	ASBC Beer-9	4,9
Densidade (g/mL)	ASBC Beer-2	1,005
Cor (EBC)	ASBC Beer-10	15 EBC
Calorias (Kcal/100mL)	ASBC Beer - 33	14 Kcal/100mL
Acidez volátil	Determinação do teor de ácidos orgânicos voláteis através da técnica de volumetria de neutralização	12 mEq/L
Resultados apresentados são médias de três replicatas. Todas as análises apresentaram coeficiente de variação menores que 5%		
<p><b>Teor alcoólico (% de álcool v/v):</b> Determinação através de cromatografia gasosa, adaptado da metodologia oficial descrita pela ASBC (Beer - 4C). <b>Determinação dos extratos (original, real e aparente)</b> – Determinação através de densitometria, sendo os extratos real e aparente medidos experimentalmente e o extrato original estimado através de cálculos (ASBC 3, 5, 6). <b>Determinação do amargor (IBU):</b> Determinação do amargor da amostra através de um processo de extração líquido-líquido, que separa os iso-alfa ácidos da cerveja, e faz a quantificação dos mesmos utilizando um espectrofotômetro (adaptação ASBC 23) <b>Determinação do pH:</b> Determinação do pH da amostra utilizando um pHmetro de bancada, com precisão de 0,01 unidades, realizado segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-9). <b>Determinação da Densidade:</b> Determinação da densidade relativa utilizando um densímetro calibrado e metodologia oficial da ASBC (Beer -2). <b>Determinação da cor:</b> Determinação da cor da amostra utilizando um espectrofotômetro, segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-10). <b>Teor calórico (Kcal/100mL):</b> Determinação do teor calórico a partir das análises de extrato e teor alcoólico (ASBC 33).</p>		

Belo Horizonte, 11/11/ 2022

  
 Dra. Beatriz Borelli  
 CRBIO: 30.593/4-D  
 Diretora Científica



**LABORATÓRIO  
DA CERVEJA**  
ANÁLISES DE TRADIÇÃO EXPERIMENTAL

Rua Ottawa 384, Jardim Canadá, Nova Lima  
contato@laboratoriodacerveja.com.br  
CNPJ: 32.293.513/0001-24

RELATÓRIO DE ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS		
<b>Amostra Cliente:</b> American Blond Ale 2% de extrato n° 2 Código Laboratório: 0403/2022		
<b>DATA DA ANÁLISE:</b> 26/10/2022 <b>HORA:</b> 09:00 <b>(uso interno)</b>		
<b>ANÁLISE REALIZADA:</b> Análises físico químicas de cerveja		
<b>Responsável pela análise:</b> Dr. Bruno Botelho (DQ-UFMG)		
IDENTIFICAÇÃO CLIENTE		
<b>Nome:</b> Vinhos Belli Ltda		
<b>Contato:</b> Eliziane Cappelin		<b>Telefone:</b> (46) 3564-1476
<b>CNPJ:</b> 11.235.786/0001-42		<b>E-mail:</b> elizianecappelin@hotmail.com
<b>Endereço:</b> Rua LINHA QUINTINO, SN - INTERIOR, Salgado Filho - PR, CEP: 85620000		
RESULTADOS		
Parâmetro	Método	Resultado
Teor álcool (% v/v)	ASBC Beer-4	1,3% v/v
Extrato aparente	ASBC Beer-3	1,3 °P
Extrato real	ASBC Beer-5	1,9 °P
Extrato Original	ASBC Beer-6	3,7 °P
Amargor	ASBC - 23	19 IBU
pH	ASBC Beer-9	4,9
Densidade (g/mL)	ASBC Beer-2	1,005
Cor (EBC)	ASBC Beer-10	17 EBC
Calorias (Kcal/100mL)	ASBC Beer - 33	15 Kcal/100mL
Acidez volátil	Determinação do teor de ácidos orgânicos voláteis através da técnica de volumetria de neutralização	12 mEq/L
Resultados apresentados são médias de três replicatas. Todas as análises apresentaram coeficiente de variação menores que 5%		
<p><b>Teor alcoólico (% de álcool v/v):</b> Determinação através de cromatografia gasosa, adaptado da metodologia oficial descrita pela ASBC (Beer - 4C). <b>Determinação dos extratos (original, real e aparente)</b> – Determinação através de densitometria, sendo os extratos real e aparente medidos experimentalmente e o extrato original estimado através de cálculos (ASBC 3, 5, 6). <b>Determinação do amargor (IBU):</b> Determinação do amargor da amostra através de um processo de extração líquido-líquido, que separa os iso-alfa ácidos da cerveja, e faz a quantificação dos mesmos utilizando um espectrofotômetro (adaptação ASBC 23) <b>Determinação do pH:</b> Determinação do pH da amostra utilizando um pHmetro de bancada, com precisão de 0,01 unidades, realizado segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-9). <b>Determinação da Densidade:</b> Determinação da densidade relativa utilizando um densímetro calibrado e metodologia oficial da ASBC (Beer -2). <b>Determinação da cor:</b> Determinação da cor da amostra utilizando um espectrofotômetro, segundo metodologia oficial da ASBC (Beer-10). <b>Teor calórico (Kcal/100mL):</b> Determinação do teor calórico a partir das análises de extrato e teor alcoólico (ASBC 33).</p>		

Belo Horizonte, 11/11/ 2022

  
Dra. Beatriz Borelli  
CRBIO: 30.593/4-D  
Diretora Científica



# LQG

Laboratório para Garantia  
da Qualidade

## Relatório de Ensaio Nº: 23840.2023- V.0

Solicitante	
Razão Social:	Industria de Vinhos Grosbelli Ltda
Proposta Comercial:	362.2023.V0
CNPJ/CPF:	11.235.786/0001-42
Endereço:	Linha Quintino, S/N Interior - Salgado Filho/PR CEP: 85620000
Contato:	Eliziane E-mail: vinicolabelli@gmail.com

Informações da Amostra			
Identificação da Amostra:	Cerveja 0	Data Validade:	NI
Data Fabricação:	NI	Lacre:	NA
Lote:	NI	Registro:	NI
Turno:	NI	Artigo:	NI
Marca:	NI	Setor de Amostragem:	NI
Ponto de Amostragem:	NI	Temperatura na Amostragem:	NI °C
Responsável pela Amostragem:	Cliente	Data Envio:	20/04/2023
Temperatura no Recebimento:	3,4 °C	Observação:	NI
Quantidade de Amostra Recebida:	300 ml		
Data de Amostragem:	20/04/2023 08:00:00		
Data Recebimento:		20/04/2023 16:32:00	
Data de Publicação:		25/04/2023	

Resultados Analíticos:					
Parâmetros	Resultados	Un Trab	Incerteza	L.Q.	Início Ensaio
<b>Microbiológico</b>					
M16 - NMP de Coliformes Totais	0	NMP/mL	-	-	20/04/2023

Referência Metodológica:	
Parâmetros	Metodologia
M16 - NMP de Coliformes Totais	ISO 4831:2012

**Notas:**  
Este relatório de ensaio refere-se somente à amostra conforme recebida e só pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração. Método de amostragem e informações da amostra são de responsabilidade do solicitante.  
Local da realização dos ensaios LQG Laboratório: Instalações permanentes.

**Legenda:**  
NMP/mL - Número Mais Provável por mililitro NI: Não informado; NA: Não aplica; L.Q.: Limite de Quantificação; ND: Não detectável; EST: Estimado; N.E: Não Especificado; VMP: Valor Máximo Permitido.

  
Aridany de Lara  
Responsável Publicação do Relatório

  
Andrea Veiga Vasconcelos  
CRQ 09202881  
Signatário Microbiologia

Código de Verificação: 0015200001513000591700202300000  
Link para acesso verificação do relatório: <https://lqglaboratorio.ultralims.com.br/validacao>


**LGQ**

 Laboratório para Garantia  
da Qualidade

**Relatório de Ensaio Nº: 23841.2023- V.0**
**Solicitante**

**Razão Social:** Industria de Vinhos Grosbelli Ltda  
**Proposta Comercial:** 362.2023.V0  
**CNPJ/CPF:** 11.235.786/0001-42  
**Endereço:** Linha Quintino,5/N Interior - Salgado Filho/PR CEP: 85620000  
**Contato:** Eliziane E-mail: vinicolabelli@gmail.com

**Informações da Amostra**

<b>Identificação da Amostra:</b>	Cerveja 0,5	<b>Data Validade:</b>	NI
<b>Data Fabricação:</b>	NI	<b>Lacre:</b>	NA
<b>Lote:</b>	NI	<b>Registro:</b>	NI
<b>Turno:</b>	NI	<b>Artigo:</b>	NI
<b>Marca:</b>	NI	<b>Sector de Amostragem:</b>	NI
<b>Ponto de Amostragem:</b>	NI	<b>Temperatura na Amostragem:</b>	NI °C
<b>Responsável pela Amostragem:</b>	Cliente	<b>Data Envio:</b>	20/04/2023
<b>Temperatura no Recebimento:</b>	3,4 °C	<b>Observação:</b>	NI
<b>Quantidade de Amostra Recebida:</b>	500 ml		
<b>Data de Amostragem:</b>	20/04/2023 08:00:00		
<b>Data Recebimento:</b>			20/04/2023 16:32:00
<b>Data de Publicação:</b>			25/04/2023

**Resultados Analíticos:**

Parâmetros	Resultados	Un Trab	Incerteza	L.Q.	Início Ensaio
<b>Microbiológico</b>					
M16 - NMP de Coliformes Totais	0	NMP/mL	-	-	20/04/2023

**Referência Metodológica:**

Parâmetros	Metodologia
M16 - NMP de Coliformes Totais	ISO 4831:2012

**Notas:**

Este relatório de ensaio refere-se somente à amostra conforme recebida e só pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração. Método de amostragem e informações da amostra são de responsabilidade do solicitante.  
 Local da realização dos ensaios LGQ Laboratório: Instalações permanentes.

**Legenda:**

NMP/mL - Número Mais Provável por mililitro NI: Não informado; NA: Não aplica; L.Q.: Limite de Quantificação; ND: Não detectável; EST: Estimado; N.E.: Não Especificado; VMP: Valor Máximo Permitido.

Ariadny de Lara  
 Responsável Publicação do Relatório

Andrea Veiga Vasconcelos  
 CRQ 09202881  
 Signatário Microbiologia

Código de Verificação: 0015200001513000591710202300000

Link para acesso verificação do relatório: <https://lgqlaboratorio.ultralims.com.br/validacao>

Av. Antônio Silvio Bartolari, nº 252, Guaporã - Foz de Iguaçu/PR CEP: 85603000 CNPJ: 30.328.192/0001-18



lgq@lgqlaboratorio.com.br

(46) 3523-6075



www.lgqlaboratorio.com.br



@lgqlaboratorio

Versão: REG-LGQ 024 REV04 - Amostra: 23841.2023 || Data Emissão: 25/04/2023 - Página: 1/1


**LGO**

 Laboratório para Garantia  
da Qualidade

**Relatório de Ensaio Nº: 23842.2023- V.0**

Solicitante	
Razão Social:	Industria de Vinhos Grosbelli Ltda
Proposta Comercial:	362.2023.V0
CNPJ/CPF:	11.235.786/0001-42
Endereço:	Linha Quintino, S/N Interior - Salgado Filho/PR CEP: 85620000
Contato:	Eliziane E-mail: vinicolabelli@gmail.com

Informações da Amostra			
Identificação da Amostra:	Cerveja 1	Data Validade:	NI
Data Fabricação:	NI	Lacre:	NA
Lote:	NI	Registro:	NI
Turno:	NI	Artigo:	NI
Marca:	NI	Setor de Amostragem:	NI
Ponto de Amostragem:	NI	Temperatura na Amostragem:	NI °C
Responsável pela Amostragem:	Cliente	Data Envio:	20/04/2023
Temperatura no Recebimento:	3,4 °C	Observação:	NI
Quantidade de Amostra Recebida:	500 ml		
Data de Amostragem:	20/04/2023 08:00:00		
Data Recebimento:		20/04/2023 16:32:00	
Data de Publicação:		25/04/2023	

Resultados Analíticos:					
Parâmetros	Resultados	Un Trab	Incerteza	L.Q.	Início Ensaio
<b>Microbiológico</b>					
M16 - NMP de Coliformes Totais	0	NMP/mL	-	-	20/04/2023

Referência Metodológica:	
Parâmetros	Metodologia
M16 - NMP de Coliformes Totais	ISO 4831:2012

**Notas:**  
Este relatório de ensaio refere-se somente à amostra conforme recebida e só pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração. Método de amostragem e informações da amostra são de responsabilidade do solicitante.  
Local da realização dos ensaios LGO Laboratório: Instalações permanentes.

**Legenda:**  
NMP/mL - Número Mais Provável por mililitro NI: Não informado; NA: Não aplica; L.Q.: Limite de Quantificação; ND: Não detectável; EST: Estimado; N.E: Não Especificado; VMP: Valor Máximo Permitido.

*Eliziane*  
Arildiany de Lara  
Responsável Publicação do Relatório

*Andrea Veiga Vasconcelos*  
Andrea Veiga Vasconcelos  
CRO 09202881  
Signatário Microbiologia

Código de Verificação: 0015200001513000591720202300000  
Link para acesso verificação do relatório: <https://lgo.laboratorio.ultralims.com.br/validacao>


**LQG**

 Laboratório para Garantia  
da Qualidade

**Relatório de Ensaio Nº: 23843.2023- V.0**

Solicitante	
Razão Social:	Indústria de Vinhos Grosbell Ltda
Proposta Comercial:	362.2023.V0
CNPJ/CPF:	11.235.786/0001-42
Endereço:	Linha Quintino, S/N Interior - Saigado Filho/PR CEP: 85620000
Contato:	Bizlane E-mail: vinicolabelli@gmail.com

Informações da Amostra			
Identificação da Amostra:	Cerveja 2		
Data Fabricação:	NI	Data Validade:	NI
Lote:	NI	Lacre:	NA
Turno:	NI	Registro:	NI
Marca:	NI	Artigo:	NI
Ponto de Amostragem:	NI	Setor de Amostragem:	NI
Responsável pela Amostragem:	Cliente	Temperatura na Amostragem:	NI °C
Temperatura no Recebimento:	3,4 °C	Data Envio:	20/04/2023
Quantidade de Amostra Recebida:	500 ml	Observação:	NI
Data de Amostragem:	20/04/2023 08:00:00		
Data Recebimento:	20/04/2023 16:32:00		
Data de Publicação:	25/04/2023		

Resultados Analíticos:					
Parâmetros	Resultados	Un Trab	Incerteza	L.Q.	Início Ensaio
<b>Microbiológico</b>					
M16 - NMP de Coliformes Totais	0	NMP/ml	-	-	20/04/2023

Referência Metodológica:	
Parâmetros	Metodologia
M16 - NMP de Coliformes Totais	ISO 4831:2012

**Notas:**  
Este relatório de ensaio refere-se somente à amostra conforme recebida e só pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração.  
Método de amostragem e informações da amostra são de responsabilidade do solicitante.  
Local da realização dos ensaios LQG Laboratório: Instalações permanentes.

**Legenda:**  
NMP/mL - Número Mais Provável por mililitro NI: Não informado; NA: Não aplica; L.Q.: Limite de Quantificação; ND: Não detectável; EST: Estimado; N.E.: Não Especificado; VMP: Valor Máximo Permitido.

*Andriany de Lara*  
Andriany de Lara  
Responsável Publicação do Relatório

*Andrea Veiga Vasconcelos*  
Andrea Veiga Vasconcelos  
CRQ 09202881  
Signatário Microbiologia

Código de Verificação: 0015200001513000591730202300000  
Link para acesso verificação do relatório: <https://lqglaboratorio.ultralims.com.br/validacao>

## 6.4 ANEXO 4

Figura 12 - Curvas de calibração das análises de antioxidantes e fenólicos totais

