

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

João Gabriel Doria

**Elaboração e Caracterização físico-química e bioativa de Cerveja estilo Saison com
adição de polpa de Amora-preta (*Morus nigra* L.)**

Florianópolis

2023

João Gabriel Doria

**Elaboração e Caracterização físico-química e bioativa de Cerveja estilo Saison com
adição de polpa de Amora-preta (*Morus nigra* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Carmen Maria Olivera Müller

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Doria, João Gabriel

Elaboração e Caracterização físico-química e bioativa de Cerveja estilo Saison com adição de polpa de Amora-preta (*Morus nigra* L.) / João Gabriel Doria ; orientadora, Carmen Maria Olivera Müller, 2023.

54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Cerveja. 3. Fruta. 4. Antocianinas. 5. Compostos Fenólicos. I. Müller, Carmen Maria Olivera. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

João Gabriel Doria

**Elaboração e Caracterização físico-química e bioativa de Cerveja estilo Saison com
adição de polpa de Amora-preta (*Morus nigra* L.)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de
“Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 21 de novembro de 2023.

Prof.^a Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Carmen Maria Olivera Müller, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Isabela Maia Toaldo Fedrigo, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Itaciara Larroza Nunes, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, professora Carmen, que aceitou me orientar neste trabalho. Obrigado por todas as correções de rumo durante a construção do TCC e, principalmente, por todos os conselhos que me deu neste momento. Agradeço também ao professor José Miguel Muller por disponibilizar o espaço, o tempo e o conhecimento durante a produção das cervejas. Agradeço ao mestrando Pietro Augusto Piccolotto pelo auxílio durante a produção das cervejas e ao doutorando Gabriel Emiliano Motta pelo auxílio durante a realização das análises. Obrigado pelos ensinamentos.

Agradeço a minha família pelo suporte e apoio durante mais uma graduação. Amo vocês.

E, principalmente, agradeço a Maria Amália Amorim, minha companheira durante todos esses anos e que sempre me apoiou, por mais complicado que fosse. Obrigado por tudo o que você fez por mim. Jamais esquecerei. Te amo.

“A boca de um homem totalmente feliz está cheia de cerveja.”

Inscrição egípcia, 2200 a.C.

(Autor Desconhecido *Apud* OLIVER, 2012)

RESUMO

Cervejas adicionadas de frutas são uma tendência do mercado mundial que ganham destaque no mercado brasileiro e, além de trazer diferentes características sensoriais, podem adicionar componentes bioativos que trazem benefícios à saúde como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, carotenoides, betalaínas, antocianinas, entre outros. Uma das frutas com potencial bioativo, que pode ser usada como ingrediente em cervejas é a Amora-preta (*Morus nigra L.*). Este estudo teve como objetivo produzir uma cerveja estilo Saison, com adição de polpa de amora-preta durante a etapa de maturação da bebida, fazer a caracterização físico-química e bioativa da bebida e avaliar sua capacidade antioxidante. Foi realizada a caracterização físico-química e bioativa da polpa de amora-preta, do mosto base, da cerveja controle e da cerveja com adição de fruta em relação ao pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, densidade específica, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e teor alcoólico e coloração EBC das cervejas controle e com adição de fruta. A polpa de amora-preta produzida apresentou teor de compostos fenólicos totais de 1380,384 mg GAE/L e teor de antocianinas monoméricas totais de 380,108 mg C3G/L, valores em níveis de grandeza similares à outras frutas vermelhas, mas abaixo do que é descrito na literatura para a espécie. A adição de polpa de amora-preta à cerveja durante a maturação resultou em um aumento significativo no teor de compostos fenólicos totais de 390,508 mg GAE/L, na cerveja controle, para 487,731 mg GAE/L, na cerveja com adição de fruta, assim como na incorporação de antocianinas (3,056 mg C3G/L) presentes apenas na cerveja com adição de fruta. A adição da polpa de fruta, porém, não representou um aumento significativo da atividade antioxidante na cerveja com adição de fruta em relação ao controle, tanto pelo método DPPH, como pelo método FRAP. Novos estudos com diferentes proporções de fruta em relação ao mosto base e investigando em qual etapa do processo produtivo há maior efetividade de extração de compostos fenólicos e antocianinas da polpa de fruta para a cerveja são necessários para determinar a proporção de fruta e a etapa de adição da fruta ideal durante o processo produtivo de modo a potencializar o efeito sobre a atividade antioxidante da bebida final.

Palavras-chave: Fruit beer. Amora. Antocianinas. Compostos Fenólicos. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Beers with added fruit are a global market trend that is gaining prominence in the Brazilian market and, in addition to bringing different sensory characteristics, they can add bioactive components that bring health benefits such as organic acids and phenolic compounds, carotenoids, betalains, anthocyanins, among others. One of the fruits with bioactive potential that can be used as an ingredient in beers is Black Mulberry (*Morus nigra* L.). This study aimed to produce a Saison-style beer, with the addition of black mulberry pulp during the beverage's maturation stage, carry out the physical-chemical and bioactive characterization of the beverage and evaluate its antioxidant capacity. The physical-chemical and bioactive characterization of black mulberry pulp, base must, control beer and beer with added fruit was carried out in relation to pH, titratable acidity, total soluble solids, specific density, total monomeric anthocyanins, total phenolics compounds, antioxidant activity by DPPH and FRAP methods and alcoholic content and EBC color of control and fruit-added beers. The black mulberry pulp produced had a total phenolic compound content of 1380.384 mg GAE/L and a total monomeric anthocyanin content of 380.108 mg C3G/L, values at levels similar to other red fruits, but below what is described in the literature for the species. The addition of black mulberry pulp to beer during maturation resulted in a significant increase in the content of total phenolic compounds from 390.508 mg GAE/L in the control beer to 487.731 mg GAE/L in the beer with added fruit, thus such as the incorporation of anthocyanins (3.056 mg C3G/L) present only in beer with added fruit. The addition of fruit pulp, however, did not represent a significant increase in antioxidant activity in beer with added fruit in relation to the control, either by the DPPH method or by the FRAP method. New studies with different proportions of fruit in relation to the base must and investigating at which stage of the production process there is greater effectiveness in extracting phenolic compounds and anthocyanins from fruit pulp for beer are necessary to determine the proportion of fruit and the ideal fruit addition stage during the production process in order to enhance the effect on the antioxidant activity of the final beverage.

Keywords: Fruit Beer. Mulberry. Anthocyanins. Phenolic Compounds. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo da cerveja.	19
Figura 2 - Estrutura básica de uma Antocianina indicando uma possível localização da carga do cátion e as posições de ligação dos radicais.	23
Figura 3 - Perfil de temperatura da mosturação da cerveja base.	31
Figura 4 - Potencial de Atividade Antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP (mmol EqT/L) e Teor de Compostos Fenólicos (mg GAE/L) para as amostras de Mosto base, Cerveja Controle e Cerveja com Fruta. As barras indicam média e intervalo de 95%, as letras indicam os resultados para análise de variância com diferença significativa entre as categorias com $p < 0,05$	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do estilo Saison de acordo com os guias de estilos BJCP e BA, indicando os limites máximos e mínimos para as características de gravidade original e final, teor alcoólico, índice de amargor e de coloração.	18
Tabela 2 – Ingredientes e adjuntos utilizados na produção do mosto base.	30
Tabela 3 – Estruturação das análises físico-químicas para as quatro categorias de amostras analisadas.....	33
Tabela 4 - Caracterização da polpa de amora-preta com dados de sólidos solúveis totais e densidade específica, a média e desvio padrão das análises físico-químicas para pH, acidez titulável, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH.	37
Tabela 5 - Caracterização físico-química do mosto base, da cerveja controle e da cerveja com fruta, apresentando resultados para sólidos solúveis totais, densidade específica, pH, acidez titulável, teor alcoólico (ABV) e cor da cerveja controle e cerveja com fruta, antocianinas monoméricas totais para a cerveja com fruta e caracterização básica do estilo Saison nos guias de estilo da BJCB ⁽¹⁾ e BA ⁽²⁾ . Para pH, acidez titulável e antocianinas monoméricas totais são apresentados valores médios e desvio padrão. Letras diferentes em sobrescrito indicam diferença significativa em análise de variância com $p < 0,05$. (OG – Gravidade original; FG – Gravidade final).....	40
Tabela 6 - Teor de antocianinas monoméricas totais na polpa de amora-preta e na cerveja com adição de fruta e a proporção de antocianinas presentes na polpa de amora-preta incorporada na cerveja com adição de fruta.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPPH – Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FRAP – Redução do ferro

CTF – Compostos Fenólicos Totais

BA – Brewers Association

BJCP – Beer Judge Certification Program

ABV – Álcool por Volume (*Alcool by Volume*)

IBU – Unidade Internacional de Amargor (*International Bitter Unit*)

EBC – European Brewery Convention

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	A CERVEJA	17
3.1.1	Processo Produtivo	18
3.2	AMORA-PRETA	22
3.3	ANTOCIANINAS	23
3.4	FRUIT BEER.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	OBTENÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA.....	25
4.2.1	Caracterização físico-química da polpa de amora-preta: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e densidade específica	25
4.2.2	Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas Monoméricas Totais da polpa de amora-preta	26
4.2.3	Atividade Antioxidante da polpa de amora-preta	28
4.3	FORMULAÇÃO DA CERVEJA BASE.....	29
4.4	PRODUÇÃO DA CERVEJA BASE.....	30
4.5	PRODUÇÃO DA CERVEJA CONTROLE E COM ADIÇÃO DE FRUTA.....	32
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS.....	32
4.6.1	Caracterização físico-química do mosto base e das cervejas controle e com fruta: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, densidade específica e teor alcoólico	33
4.6.2	Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas Monoméricas Totais	34
4.6.3	Capacidade Antioxidante	35
4.6.4	Determinação da Cor	35
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA.....	37
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS.....	39

5.3	DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CERVEJAS	42
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é um dos alimentos processados mais antigos produzidos pela humanidade. É considerado um dos pilares dos primeiros assentamentos humanos, onde uma grande parte dos cereais cultivados eram destinados para a produção de cerveja (Oliver, 2012). A bebida, pelo teor alcoólico resultante do processo de fermentação, era um dos poucos líquidos seguros para serem ingeridos quando a água potável era escassa (Oliver, 2012; Raihofer *et al.*, 2022). Dessa forma, a cerveja se tornou uma bebida fundamental para a cultura alimentar em diferentes regiões do mundo onde a cevada e o trigo eram os cereais disponíveis para o cultivo, em especial na Europa.

Existem diversos tipos de cervejas, resultado, principalmente, do relativo isolamento existente entre os centros produtores, o que resultou no surgimento de cervejas com características, ingredientes e culturas diferentes dependendo da região geográfica onde se desenvolveram. Estes aspectos levaram a que na atualidade existam quatro principais “Escolas Cervejeiras”: a Alemã, a Inglesa, a Belga e a Americana (Oliver, 2012). No que se refere ao Brasil, foram produzidas cervejas mais próximas aos estilos da escola alemã, resultado da forte influência que esta imigração teve na formação cultural do povo brasileiro (Limberger, 2014). Mais recentemente, a partir do final do século XX e início do século XXI, com o crescimento e expansão de micro e pequenas cervejarias, ocorreu uma diversificação nos estilos de cervejas produzidas no país.

De acordo com o Anuário da Cerveja (Brasil, 2022) em 2021 existiam, no Brasil, 1549 cervejarias registradas, o que correspondia a um aumento de 12% com relação ao ano anterior. Essa variedade de cervejarias se correlaciona com a diversidade de produtos produzidos. Em 2021 constavam 35.741 produtos diferentes registrados, o que corresponde a um aumento de 5,2% com relação ao ano anterior (Brasil, 2022). Nesse cenário, o estado de Santa Catarina se destaca com 195 cervejarias (aumento de 20% com relação a 2020) e 4.372 produtos (Brasil, 2022).

Esse aumento expressivo, tanto na quantidade de cervejarias, quanto na variedade de produtos, promoveu a diversidade de estilos produzidos no país. E neste contexto, os cervejeiros brasileiros, se inspirando no exemplo da Escola Americana, começaram a desenvolver cervejas visando o mercado interno e a utilização de ingredientes autóctones. Um desses estilos é o *Season*, um estilo de origem Belga, com características marcantes derivadas da variedade de levedura utilizada na sua fermentação e que comumente é produzido com a adição de frutas na sua formulação. Cervejas adicionadas de frutas é uma tendência do mercado mundial que ganha

destaque no mercado brasileiro devido à grande variedade de frutas endêmicas e cultivadas no Brasil (Moreno *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023). Nestas cervejas, a adição de frutas, além de trazer diferentes características sensoriais, pode adicionar componentes bioativos que trazem benefícios à saúde como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, carotenoides, betalainas, antocianinas, entre outros (Habschied *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023).

Diversos estudos avaliaram a influência da adição de diferentes frutas em parâmetros físico-químicos de cervejas: como pitanga (Lima *et al.*, 2021), pêra (Moreno *et al.*, 2022; Nardini; Garaguso, 2020), jabuticaba (Imaizumi *et al.*, 2020), goji (Ducruet *et al.*, 2017), cereja, framboesa, damasco, uva, ameixa, laranja e maçã (Nardini; Garaguso, 2020). Essas cervejas produzidas com frutas apresentaram atividade antioxidante associada aos componentes provenientes da própria cerveja (Tirado-Kulieva *et al.*, 2023; Yang; Gao, 2021), do processo de fabricação e da fruta adicionada, constituindo uma linha de pesquisa relevante para a indústria (Habschied *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023). A caracterização desses compostos bioativos e da capacidade antioxidante da cerveja produzida com a adição de frutas (Nardini; Garaguso, 2020) é necessária para a compreensão dos efeitos sobre as propriedades que estas bebidas podem apresentar (Habschied *et al.*, 2020; Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021).

Dessa forma, a adição de ingredientes que apresentam ação bioativa, como frutas e outras partes de plantas, fungos e própolis, que possuem um potencial de agregar novas qualidades à cerveja é um campo de pesquisa a ser explorado (Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021). Uma das frutas com potencial bioativo, que pode ser usada como ingrediente em cervejas é a Amora-preta (*Morus nigra* L.). Estudos que avaliaram a capacidade antioxidante de amoras do gênero *Morus* demonstram que essa fruta tem um grande potencial bioativo associado à sua composição rica em ácidos orgânicos, antocianinas, monoterpênicos e polifenóis (Donno *et al.*, 2015; Ercisli; Orhan, 2007; Naderi *et al.*, 2004; Özgen; Serçe; Kaya, 2009; Paunović; Mašković; Milinković, 2022). Neste contexto, este estudo tem como objetivo produzir uma cerveja estilo Saison, com adição de polpa de amora-preta, realizar sua caracterização físico-química e bioativa e avaliar a capacidade antioxidante da bebida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma cerveja estilo Saison com a adição de polpa de amora-preta, determinar a presença de compostos bioativos e avaliar sua capacidade antioxidante em relação à cerveja controle (sem adição de fruta).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a polpa de amora-preta em termos de pH, acidez titulável e teor de compostos fenólicos totais;
- Determinar o teor de antocianinas totais na polpa de amora-preta;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* da polpa de amora-preta pelos métodos de Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e Redução do ferro (FRAP);
- Desenvolver uma cerveja estilo *Saison* com a adição de polpa de amora-preta na etapa de maturação da bebida e sem adição de fruta (Controle);
- Determinar a cor e o teor alcoólico da cerveja com adição de polpa de amora-preta e da cerveja sem adição de fruta (Controle);
- Determinar o pH e a acidez titulável do mosto base, da cerveja com adição de polpa de amora-preta e da cerveja sem adição de fruta (Controle);
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais no mosto base, na cerveja com adição de polpa de amora-preta e na cerveja sem adição de fruta (Controle);
- Determinar o teor de antocianinas totais na cerveja com adição de polpa de amora-preta;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de Redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e Redução do ferro (FRAP) do mosto base, da cerveja com adição de polpa de amora-preta e da cerveja sem adição de fruta (Controle).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A CERVEJA

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada produzida a partir de quatro ingredientes básicos: água, malte, lúpulo e levedura (ou fermento). As diferentes proporções e variedades desses ingredientes, assim como variações nos tempos e temperaturas dos processos de fabricação da bebida proporcionam a elaboração de uma grande variedade de cervejas, dentro e entre os diversos estilos da bebida. A legislação brasileira define, no Decreto nº 6871/2009, a cerveja como “[...] a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (Brasil, 2009). A denominação de cerveja e seus tipos é regulada pela Instrução Normativa nº 65/2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e permite o uso das denominações tradicionais dos estilos cervejeiros, determinando apenas a classificação quanto à proporção de matéria-prima malteada e ao teor alcoólico (Brasil, 2019). Essa mesma legislação determina também a proibição da adição de qualquer tipo de álcool, de edulcorantes e de água fora das plantas fabris na produção da bebida (Brasil, 2019).

O estilo *Saison* pertence a escola Belga e tem como característica marcante o aroma e sabor proveniente do fermento utilizado em sua fabricação. As cervejas desse estilo estão caracterizadas nos dois principais guias de estilo existentes, o guia BA da Brewers Association dos Estados Unidos (Brewers-Association, 2022) e o guia BJCP da Beer Judge Certification Program (Strong; England, 2021). Nesses guias o estilo é descrito como uma cerveja belga do tipo Ale, com alta atenuação e com corpo baixo, de amargor médio e caracterizada por um perfil de fermentação marcado por aroma e sabor frutado e de especiarias. No guia BA cervejas desse estilo estão caracterizadas como “Classic French & Belgian-Style Saison” e no guia BJCP o estilo é descrito com o código “25B. Saison”. As características básicas do estilo são definidas conforme descrito na Tabela 1.

Quando essa cerveja é adicionada de algum ingrediente especial o guia BA tem uma categoria distinta para englobar essa variação da cerveja Saison, a *Speciality Saison* que engloba as cervejas desenvolvidas com o estilo Saison clássico como base, mas com a adição de algum ingrediente especial que terá papel central na característica sensorial da cerveja. Esses ingredientes especiais podem ser ervas, frutas, maltes especiais escuros ou fermentos especiais

que vão acrescentar características únicas à cerveja e devem ser identificados na descrição da cerveja. Entretanto, Saisons com a adição de frutas também podem ser categorizadas em um outro estilo, o *Belgian-Style Fruit Beer*, que inclui cervejas de estilos belgas com a adição de frutas em sua composição (Brewers-Association, 2022).

Tabela 1 - Características do estilo Saison de acordo com os guias de estilos BJCP e BA, indicando os limites máximos e mínimos para as características de gravidade original e final, teor alcoólico, índice de amargor e de coloração.

	BJCP	BA
Gravidade original	1,048-1,065	1,040-1,060
Gravidade final	1,002-1,008	1,004-1,008
	3,5-5,0% (table)	
Teor alcoólico (ABV)	5,0-7,0% (standard)	5,0-6,8%
	7,0-9,5% (super)	
Amargor (IBU)	20-35	20-38
	9-27 (pale)	
Cor (EBC)	29-43 (dark)	6-14

Fonte: Brewers-Association (2022); Strong e England (2021).

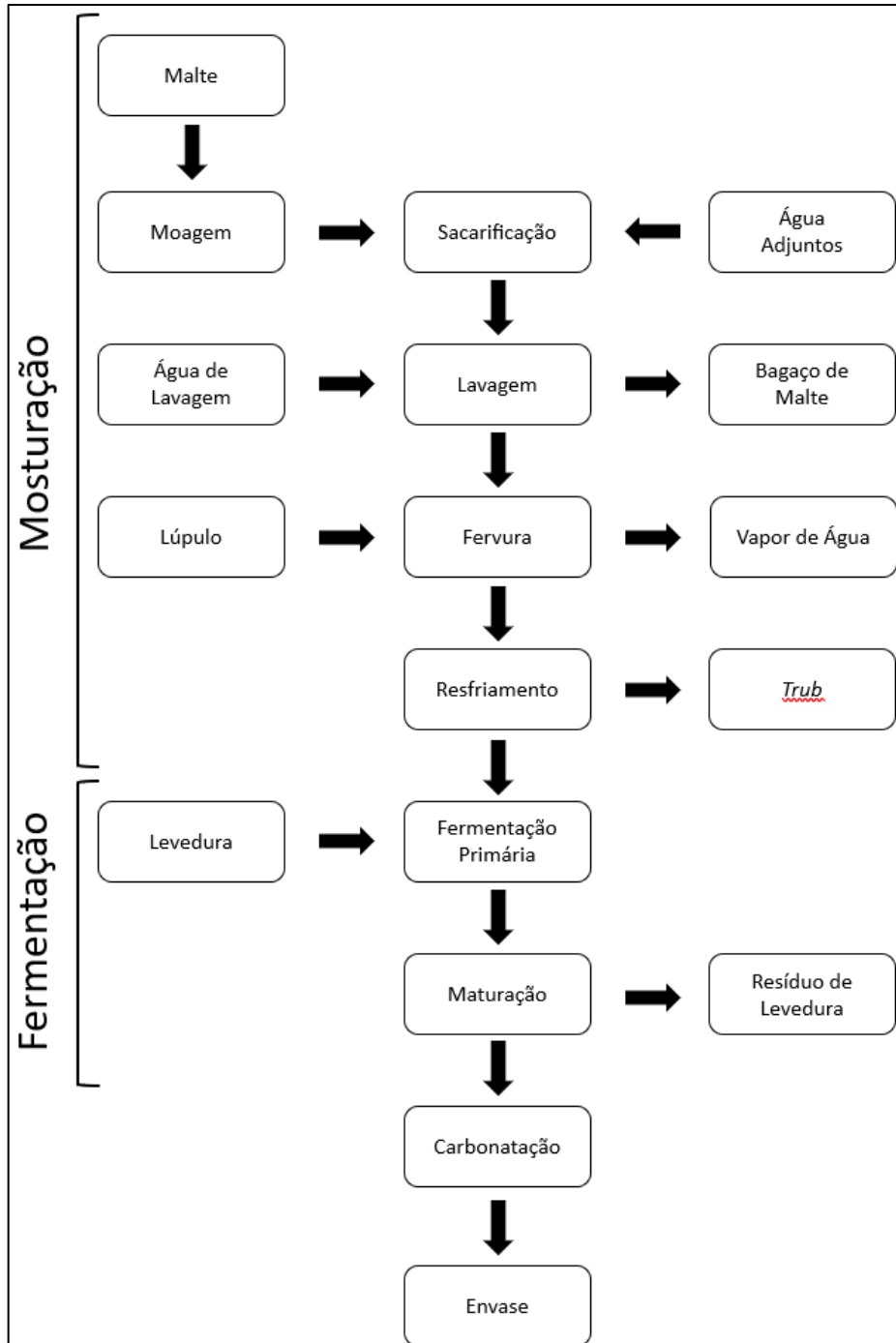
Já no guia da BJCP uma cerveja Saison com adição de ingredientes especiais, também pode ser categorizada em mais de um estilo dentre os estilos de *Speciality Beer* dependendo do tipo de ingrediente utilizado. As cervejas do estilo *Saison* com a adição de frutas são categorizadas como “29A. Fruit Beer” e devem ter identificados o estilo base e a fruta adicionada (Strong; England, 2021).

3.1.1 Processo Produtivo

O processo produtivo da cerveja pode ser dividido em duas grandes etapas: i) a Mosturação e ii) a Fermentação. A Mosturação é a etapa realizada a quente, onde os ingredientes passam pelo processo de cocção e ocorre a ação enzimática endógena do malte que promove a sacarificação do amido. Já, a etapa de Fermentação é realizada a temperaturas mais baixas (etapa fria) e nela ocorre o processo de fermentação do mosto base produzido durante a

mosturação pelas leveduras, os açúcares serão metabolizados em álcool e outros compostos. Um fluxograma com as etapas do processo produtivo de uma cerveja é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo da cerveja.



Fonte: Autor (2023)

3.1.1.1. Mosturação

A Mosturação, por sua vez, é dividida em etapas que se caracterizam pela ação bioquímica de enzimas diferentes. Cada uma dessas etapas é realizada em temperaturas diferentes e, dessa forma, compõem o que é denominado de rampas de temperatura da mosturação. O desenvolvimento de formulação de uma cerveja inclui o estabelecimento de diferentes rampas de temperatura com objetivos específicos. Obrigatoriamente, o processo de elaboração de todas as cervejas é realizado utilizando duas rampas de temperatura, podendo ser executadas rampas adicionais, dependendo do objetivo.

A primeira rampa de temperatura obrigatória tem o objetivo de promover a Sacarificação do amido presente no malte. Duas são as enzimas que atuam nesse processo, denominadas enzimas de sacarificação: a α -amilase e a β -amilase. Enquanto a α -amilase hidrolisa as cadeias de amilose e amilopectina em dextrinas de 7 a 12 resíduos de glicose, a β -amilase cliva porções de dois resíduos (maltose) a partir da terminação não-redutora das cadeias. A faixa de temperatura ótima de ação dessas enzimas varia entre 60°C e 65°C para a β -amilase e entre 72°C e 75°C para a α -amilase (Kunze, 2004).

A segunda rampa de temperatura obrigatória (rampa de *mash-out*) tem como objetivo promover a inativação das enzimas de sacarificação do amido e facilitar os processos de filtração e clarificação do mosto. A α -amilase é rapidamente inativada em temperaturas acima de 80°C e a β -amilase é inativada a partir de 70°C (Kunze, 2004). Além da inativação enzimática, a rampa de *mash-out* tem a função de manter o mosto com viscosidade baixa de forma a facilitar a filtração dos resíduos do malte e transferir para a etapa de fervura um mosto com a menor carga possível de impurezas e partículas em suspensão de malte (Briggs *et al.*, 2004). Esse processo é realizado com a recirculação da fração líquida do mosto, que é aspergida sobre a camada de bagaço de malte (fração sólida) sucessivas vezes. Este procedimento promove um aumento na concentração de sacarídeos fermentescíveis e melhora o processo de filtração produzindo um mosto mais límpido, de modo que a fervura ocorra sem a formação de defeitos provenientes do cozimento de partículas de malte (Kunze, 2004).

Finalmente é realizada a fervura do mosto (em torno de 1 hora) que tem como objetivos principais promover a esterilização do mosto e a extração e modificação de compostos do lúpulo, embora também promova a concentração de sacarídeos fermentescíveis (Briggs *et al.*, 2004).

3.1.1.2. Fermentação

Após a produção do mosto cervejeiro, o líquido é transferido para o fermentador onde é mantido em temperatura controlada e é adicionado da cultura de levedura que será responsável

pela fermentação alcoólica do mosto. Esse processo pode ser realizado com a utilização de diferentes cepas de leveduras, ou de outros organismos fermentadores, e a variedade de microrganismos utilizada também será responsável pelas características sensoriais do produto final e da classificação do estilo da cerveja produzida (Briggs *et al.*, 2004). O uso de leveduras do tipo Ale (variedades de *Saccharomyces cerevisiae*), também chamadas de alta fermentação, ou de leveduras do tipo Lager (variedades de *S. pastorianus*), também chamadas de baixa fermentação, vão promover diferentes processos fermentativos e produzir distintos estilos da cerveja. Enquanto as leveduras do tipo Ale realizam a fermentação em temperaturas de 15°C a 24°C, as leveduras do tipo Lager o fazem em temperaturas de 5°C a 14°C (Sicard; Legras, 2011). Outros microrganismos também podem ser utilizados, incluindo espécies diferentes de leveduras (como cepas do gênero *Brettanomyces*), bactérias ácido lácticas (usadas na produção de cervejas do tipo Sour) e cervejas produzidas com fermentação espontânea, como as do estilo Lambic (Iattici; Catallo; Solieri, 2020).

Durante a fermentação, as leveduras transformam os açúcares fermentáveis do mosto em álcool etílico e gás carbônico. Esse processo reduz a densidade específica do líquido e a interrupção dessa queda na densidade da bebida é o indicador do final do processo, sinalizando que todos os açúcares passíveis de serem fermentados pelas leveduras foram consumidos. Além disso, a fermentação também produz uma série de subprodutos que possuem efeitos importantes nas características de aroma e sabor do produto final e estão diretamente relacionados com a variedade de microrganismos utilizada na produção da cerveja (Kunze, 2004).

A fermentação da cerveja é dividida em 3 etapas que vão ser caracterizadas por processos diferentes. No início do processo de fermentação a levedura passa por uma rápida multiplicação, com suas células se dividindo rapidamente e consumindo o oxigênio presente no mosto. Nessa fase as leveduras realizam respiração aeróbica e não ocorre a produção de etanol. Com o esgotamento do oxigênio presente, as leveduras passam a realizar respiração anaeróbica e ocorre a fermentação propriamente dita, a fermentação primária, com a consequente transformação de açúcares em etanol. Esse processo se estende até o esgotamento dos açúcares fermentáveis (Briggs *et al.*, 2004). A temperatura em que a fermentação é realizada é definida pela variedade de microrganismos utilizada e pelas características finais desejadas na cerveja, uma vez que diferentes temperaturas de fermentação promovem processos metabólicos diferentes (Kunze, 2004).

Após a fermentação primária a temperatura do sistema deve ser reduzida para valores entre 0°C e 4°C de forma que ocorra o processo de maturação e clarificação da cerveja (também chamado de fermentação secundária). Nessa etapa as leveduras realizam processos metabólicos

que modificam os compostos produzidos na mosturação e na fermentação primária, promovendo a definição dos aromas e sabores da cerveja, além de equilibrar sensorialmente o produto (Svedlund *et al.*, 2022). A diminuição da temperatura também vai induzir as leveduras a reduzirem seu metabolismo, sofrerem apoptose, e flocularem. As células de leveduras em senescência se aglomeram formando flocos e isso faz com que esses aglomerados decantem para o fundo do fermentador formando uma borra que posteriormente é separada da fase líquida (a cerveja). Esse processo torna a cerveja mais clara, já que o material particulado, como células de levedura, proteínas em suspensão e outras impurezas, acabam floculando junto com as leveduras e decantando também. Dessa forma, a cerveja que antes era turva, acaba se tornando translúcida sem a necessidade de filtração (Briggs *et al.*, 2004).

Há estilos que são naturalmente turvos e outros que são naturalmente translúcidos. Cervejas comerciais passam, geralmente, por um processo de filtração após a maturação para fazer a clarificação de forma forçada. A cerveja maturada é filtrada com o uso de filtros-prensa ou de bandeja utilizando-se terra-diatomácea como material filtrante, o que acelera o processo de clarificação já que a cerveja é clarificada imediatamente, em vez de passar dias até o final da decantação das leveduras (Kunze, 2004).

3.2 AMORA-PRETA

A árvore popularmente conhecida como “Amoreira” pode ser associada a diversas espécies de distintas famílias. Espécies do gênero *Rubus*, da família Rosaceae, e do gênero *Morus*, da família Moraceae, são as mais cultivadas mundialmente, sendo o gênero *Morus* especialmente importante, por ter suas folhas utilizadas para a alimentação do bicho-da-seda (*Bombix mori*) em criações desses insetos (Weiguo *et al.*, 2005). Algumas espécies também são cultivadas para a obtenção dos seus frutos múltiplos, derivados de uma inflorescência.

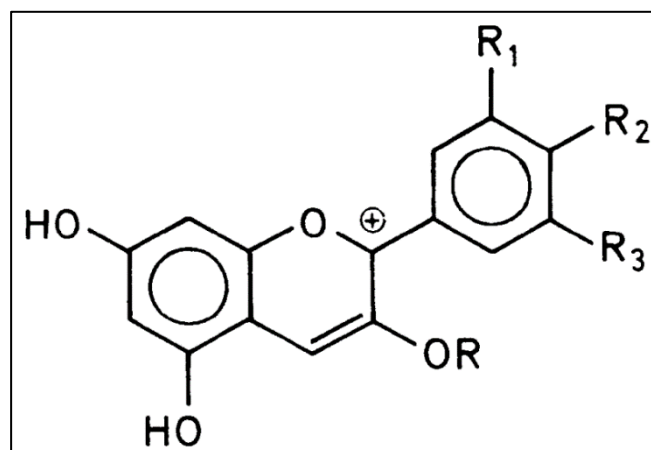
A amora-preta (*Morus nigra* L.) é uma das espécies do gênero *Morus* cultivados no Brasil. Os frutos dessa árvore são consumidos de diversas formas, tanto *in natura* como fazendo parte de diversos produtos processados como geleias, sorvetes, doces, sucos e bebidas alcoólicas (Pawlowska; Oleszek; Braca, 2008). Além das frutas, outras partes da planta também são usados como medicamentos tradicionais para o tratamento de diversas questões de saúde e apresenta uma diversa gama de compostos bioativos (Lim; Choi, 2019; Maqsood *et al.*, 2022; Ramappa *et al.*, 2020) associados à alta capacidade antioxidante dessa fruta, como polifenóis e antocianinas (Özgen; Serçe; Kaya, 2009; Paunović; Mašković; Milinković, 2022).

Estudos avaliando a capacidade antioxidante de *Morus nigra* comprovam a forte capacidade antioxidante dessa planta, tanto trabalhando com extratos de folhas (Souza *et al.*, 2018), como trabalhando com as próprias frutas (Naderi *et al.*, 2004; Özgen; Serçe; Kaya, 2009; Paunović; Mašković; Milinković, 2022). Quando comparado com outras espécies do mesmo gênero, *M. nigra* apresenta uma maior capacidade antioxidante do que *M. alba* (amora-branca) e *M. rubra* (amora-vermelha) (Gundogdu *et al.*, 2011), assim como um maior teor de compostos fenólicos e flavonoides (Ercisli; Orhan, 2007).

3.3 ANTOCIANINAS

Antocianinas são pigmentos presentes em todos os tipos de plantas e possuem cores desde o laranja rosado até os tons vermelhos, púrpuras e azuis (Santos-Buelga; González-Paramás, 2018). São compostos da família dos flavonoides e sua estrutura apresenta um esqueleto de flavílio com hidroxilações e metilações diversas (Figura 3), podendo realizar múltiplas reações que previnem a oxidação de moléculas oxidáveis em sistemas orgânicos (Wright *et al.*, 2021). Essas moléculas estão presentes em uma diversa gama de frutas e vegetais e apresentam alta capacidade antioxidante (Özgen; Serçe; Kaya, 2009). Em espécies do gênero *Morus* a antocianina mais abundante é a cianidina e suas variações (Pawłowska; Oleszek; Braca, 2008; Saensouk *et al.*, 2022)

Figura 2 - Estrutura básica de uma Antocianina indicando uma possível localização da carga do cátion e as posições de ligação dos radicais.



Fonte: Adaptado de Belitz; Grosch e Schieberle (2009).

3.4 FRUIT BEER

As cervejas com adição de frutas são genericamente chamadas de *Fruit beers*. Essas cervejas podem pertencer a diversos estilos e a fruta é um ingrediente obrigatório. No guia da BJCP (Strong; England, 2021) a seção 29 descreve 4 estilos de *Fruit beers* (*Fruit beer*, *Fruit and Spice beer*, *Specialty Fruit beer* e *Grape Ale*) e que podem ser desenvolvidos a partir de vários estilos base descritos no guia. Um dos poucos estilos tradicionais com adição obrigatória de frutas é o *Fruit Lambic*, uma cerveja ácida e de fermentação selvagem, e que pode levar a adição de frutas durante a fermentação ou como *blending* antes do envase. Além desse estilo, na última edição do Guia BJCP foi incluído o primeiro estilo brasileiro, o *Catharina Sour*, uma cerveja ácida e com frutas, derivada do estilo *Berliner Weisse* e desenvolvida no estado de Santa Catarina (Strong; England, 2021).

Independente do estilo da cerveja, a adição de frutas tem como objetivo a incorporação de aromas e sabores diferenciados para o produto e agrega valor à bebida (Zhao *et al.*, 2023). Além disso, a incorporação de compostos bioativos provenientes da fruta adicionada pode trazer características específicas à cerveja (Habschied *et al.*, 2020). Estudos que avaliaram a influência da adição de frutas na produção de cerveja reportam um incremento na capacidade antioxidante e teor de polifenóis da cerveja com fruta em relação ao controle, sem adição de fruta (Belcar; Gorzelany, 2022; Gasiński, A. *et al.*, 2020; Kawa-Rygielska *et al.*, 2019; Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021). Esse incremento de atividade antioxidante pode proporcionar uma maior estabilidade ao produto e reduzir os efeitos do envelhecimento por oxidação da cerveja (Zhao *et al.*, 2023).

A adição de fruta e o potencial incremento na quantidade e variedade de compostos bioativos varia de acordo não só com o tipo de fruta adicionado à bebida, mas também com o momento do processo produtivo em que a fruta é adicionada (Cunha *et al.*, 2023; Ducruet *et al.*, 2017; Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021). As etapas do processo produtivo onde a fruta pode ser adicionada vai determinar alterações nas características incorporadas à cerveja (Cunha *et al.*, 2023). As frutas incorporadas na fervura apresentam uma maior extração de polifenóis e compostos bioativos, proporcionando uma maior capacidade antioxidante (Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021), porém a ação da temperatura pode deteriorar compostos de interesse (Cunha *et al.*, 2023). Na etapa de fermentação, tanto na fermentação primária, quanto na fermentação secundária ou maturação da cerveja, a temperatura não será um fator de deterioração dos compostos bioativos e os aromas e sabores incorporados serão mais próximos da fruta fresca (Paiva; Mutz; Conte-Junior, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA

A polpa de Amora-preta foi produzida a partir de frutas coletadas em uma propriedade particular no município de Florianópolis. Após a coleta as frutas maduras foram higienizadas, acondicionadas em recipientes de polipropileno (PP), congeladas em congelador doméstico a -20°C e mantidas congeladas até o momento do processamento. As frutas não passaram por qualquer tipo de processo para inativação enzimática.

Os 2,25 kg de frutas obtidas foram descongelados e triturados em liquidificador com a adição de 340,45 g de água para facilitar a trituração. Foi produzido um total de 2,59 kg de polpa de amora-preta com concentração de 86,86% de fruta. Após a coleta de uma alíquota para as análises (acondicionada em tubo falcon e congelada para análise posterior), 2,2 kg foram utilizados na produção da cerveja com polpa de fruta.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA

Para a amostra de polpa de amora-preta foram determinados os parâmetros de potencial da atividade antioxidante pelos métodos de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e redução do ferro (FRAP), o teor de antocianinas monoméricas totais, o teor de compostos fenólicos totais, a acidez titulável, o pH, o teor de sólidos solúveis totais e a densidade específica do líquido.

4.2.1 Caracterização físico-química da polpa de amora-preta: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e densidade específica.

4.2.1.1. pH

A medição do pH da amostra de polpa de amora-preta foi realizada por medição direta com pHmetro previamente calibrado conforme Zenebon; Pascuet e Tiglea (2008).

4.2.1.2. Acidez titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Zenebon; Pascuet e Tiglia (2008), utilizando solução padronizada de NaOH 0,1 M como titulante. A amostra de polpa de amora-preta foi previamente diluída na proporção 1:5 e titulada em duplicata com 10 mL de amostra diluída. Devido a coloração das amostras considerou-se o ponto de viragem de pH 8,2-8,4 medido com o uso de pHmetro. Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico por 100 mL de amostra (g AC/100mL) e calculados de acordo com a fórmula abaixo:

$$(n \times M \times f \times PM)/(10 \times V) = \text{ácidos totais} \quad (1)$$

Onde:

n = volume gasto da solução de NaOH (mL)

M = molaridade da solução de NaOH

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

PM = peso molecular do ácido cítrico (192,124 g/mol)

V = volume tomado da amostra (mL)

4.2.1.3. Sólidos Solúveis Totais

O teor de sólidos solúveis totais da fase líquida da polpa de amora-preta foi medido com o uso de um refratômetro manual e o resultado expresso em °brix. A amostra foi diluída na proporção 1:10 para a realização da leitura do resultado.

4.2.1.4. Densidade específica

A densidade específica da fase líquida da polpa de amora-preta foi medida com o uso de um densímetro calibrado a 20 °C e o resultado expresso em g/cm³.

4.2.2 Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas Monoméricas Totais da polpa de amora-preta

4.2.2.1. Compostos Fenólicos Totais

A determinação da quantidade de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método da capacidade redutora de Folin-Ciocalteu (Lamuela-Raventós, 2018) com

adaptações. A amostra de polpa de amora-preta foi preparada inicialmente para uma diluição de 1:2 com a diluição de 5 µL de amostra em 5 µL de água destilada. Foram misturados 600 µL de água destilada, 10 µL da amostra preparada e 50 µL da solução FOLIN. Foi aguardado 1 minuto e adicionados 150 µL de solução de carbonato de sódio 20% e 190 µL de água destilada. Foram transferidos 300 µL da amostra preparadas para a placa de leitura em quadruplicata. Brancos para a amostra e para a solução Folin também foram preparados. As amostras e brancos preparadas foram mantidos para reagir na ausência de luz por duas horas e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm.

A concentração de compostos fenólicos totais foi calculada usando uma curva padrão de Ácido Gálico descrita pela equação “ $y = 0,9825x + 0,0632$ ” com R^2 igual a 0,9968 como referência. Os dados foram apresentados em mg de ácido gálico equivalente por litro (mg GAE/L).

4.2.2.2. Antocianinas Monoméricas Totais

A determinação do teor de antocianinas monoméricas totais foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Giusti e Wrolstad (2005) com adaptações. Foram utilizadas soluções tampão para pH 1 e para pH 4,5. A amostra foi preparada em uma diluição de 1:15 (20 µL de amostra e 280 µL de solução tampão). A amostra foi preparada em quadruplicata para os tampões em pH 1 e em pH 4,5. As amostras preparadas tiveram a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm e de 700 nm.

A concentração de antocianinas totais foi calculada usando as formulas abaixo e os resultados foram apresentados em mg de cianidina-3-glicosídeo por litro (mg C3G/L).

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 1} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 4,5} \quad (4)$$

$$\text{cianidina - 3 - glicosídeo (mg} \times L^{-1}\text{)} = (A \times MW \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times 1) \quad (5)$$

Onde:

A = Absorbância da amostra

$A_{\lambda 520}$ = Absorbância no comprimento de onda de 520 nm

$A_{\lambda 700}$ = Absorbância no comprimento de onda de 700 nm

MW = Peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol)

DF = Fator de diluição da amostra

ε = Absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo (26.900)

4.2.3 Atividade Antioxidante da polpa de amora-preta

4.2.3.1. Atividade Antioxidante pelo método de DPPH

A determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) com adaptações. A solução estoque de DPPH foi preparada com a dissolução de 0,0235 g de DPPH em 100 mL de Etanol e armazenada sob refrigeração até o uso. Para as análises a solução estoque foi diluída para a concentração de 125 $\mu\text{mol/L}$ com a adição de 5,2 mL da solução estoque em um balão de 25 mL e completado com 19,8 mL de Etanol. A amostra de polpa de fruta foi preparada inicialmente para uma diluição de 1:40 (1,25 μL de amostra bruta e 48,75 μL de água destilada).

A amostra diluída de polpa de amora-preta passou por uma diluição seriada que resultou em diluições de 1:40, 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400. 50 μL de cada diluição seriada foi adicionada de 250 μL de DPPH 125 $\mu\text{mol/L}$ em quadruplicata. Foram preparados brancos para a amostra com o uso de 50 μL da amostra diluída inicial com 250 μL de solvente e também para a solução de DPPH com a mistura de 50 μL de solvente com 250 μL de DPPH 125 $\mu\text{mol/L}$. As amostras e brancos preparadas foram mantidos para reagir na ausência de luz por 30 minutos e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

A diluição seriada foi realizada para garantir a ocorrência de leitura de absorbância dentro dos limites da curva padrão de Trolox utilizada para calcular as concentrações de antioxidantes totais. Dessa forma, foram utilizadas as leituras de absorbância nas diluições que apresentaram resultados dentro dos limites da curva padrão e com os menores valores de desvio padrão para os cálculos das concentrações. Para a amostra de polpa de amora-preta foi utilizado os resultados na diluição de 1:100. A concentração de antioxidantes totais foi calculada usando uma curva padrão de Trolox descrita pela equação “ $y = 0,0020x + 0,9403$ ” com R^2 igual a 0,9844 como referência. Os dados foram apresentados em mmol Equivalente Trolox por litro (mmol EqT/L).

4.2.3.2. Atividade Antioxidante pelo método de FRAP

A determinação capacidade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996) com adaptações. Os reagentes foram preparados com a dissolução de 3,31 mL de HCl em 1 L de água destilada (Solução de HCl 20

mM); 0,027 g de FeII em 5 mL de água destilada (Solução de FeII₃H₂O 20 mM); de 0,016 g de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazina) em 5 mL de HCl (Solução TPTZ); e 1,87 g de acetato de sódio anidro e 16 mL de ácido cítrico global em água destilada para um volume final de 1 L e a verificação do pH de 3,6 (Solução tampão). A solução FRAP foi preparada com a mistura de 50 mL de solução tampão, 5 mL de solução TPTZ e 5 mL de solução de FeII₃H₂O.

Para as análises a amostra de polpa de fruta foi preparada em uma diluição de 1:100 (3 µL de amostra e 297 µL de solução FRAP) em quadruplicata. Foi preparado o branco com 300 µL de solução FRAP em quadruplicata. As amostras e branco preparadas foram mantidos para reagir na ausência de luz por 30 minutos e a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 593 nm.

A concentração de antioxidantes totais foi calculada usando uma curva padrão de Trolox descrita pela equação “ $y = 0,00106x - 0,01157$ ” com R² igual a 0,9956 como referência. Os dados foram apresentados em mmol Equivalente Trolox por litro (mmol EqT/L).

4.3 FORMULAÇÃO DA CERVEJA BASE

A formulação da cerveja no presente estudo foi desenvolvida com base no estilo *Saison*, para um volume final de 55 litros de mosto cervejeiro. Os ingredientes e adjuntos utilizados para a produção do mosto base são apresentados na tabela 2. O cloreto e o sulfato de cálcio foram adicionados à água para corrigir a concentração de íon Ca²⁺ na água, promovendo a estabilização da α-amilase durante a sacarificação do amido e favorecendo a eficiência do processo (Briggs *et al.*, 2004).

Os dois maltes utilizados são da Maltaria Uma Malta (Argentina). Foram usados 6 kg de malte tipo Pilsen e 6 kg de malte tipo Viena moídos no dia da produção. Como lúpulo de amargor foram utilizados 35 g da variedade Citra em pellets adicionados no início da fervura. Como lúpulo de aroma foram utilizados 35 g da variedade SAAZ em pellets adicionados faltando 15 minutos para o final da fervura. Para a fermentação foram utilizadas 33 g da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) liofilizada da marca Lallemand do tipo “Belle Saison”.

A mosturação foi realizada com um perfil de temperatura em duas etapas, com apenas uma rampa de temperatura de sacarificação a 68°C por 60 minutos e uma rampa de temperatura de *Mash out* a 75°C por 15 minutos (Figura 2). A fervura do mosto foi mantida por 60 minutos com a adição de lúpulo de amargor no tempo no início da fervura e de lúpulo de aroma faltando 15 minutos para o final da fervura. Após a fervura e o resfriamento do mosto, uma alíquota do mosto base foi coletada e congelada para análise posterior. A fermentação foi realizada em

fermentador de inox com temperatura controlada, utilizando um perfil de temperatura a 20°C por 11 dias para a fermentação primária, seguido da transferência da cerveja base para dois fermentadores mantidos a 6°C por 15 dias para a maturação e clarificação.

Tabela 2 – Ingredientes e adjuntos utilizados na produção do mosto base.

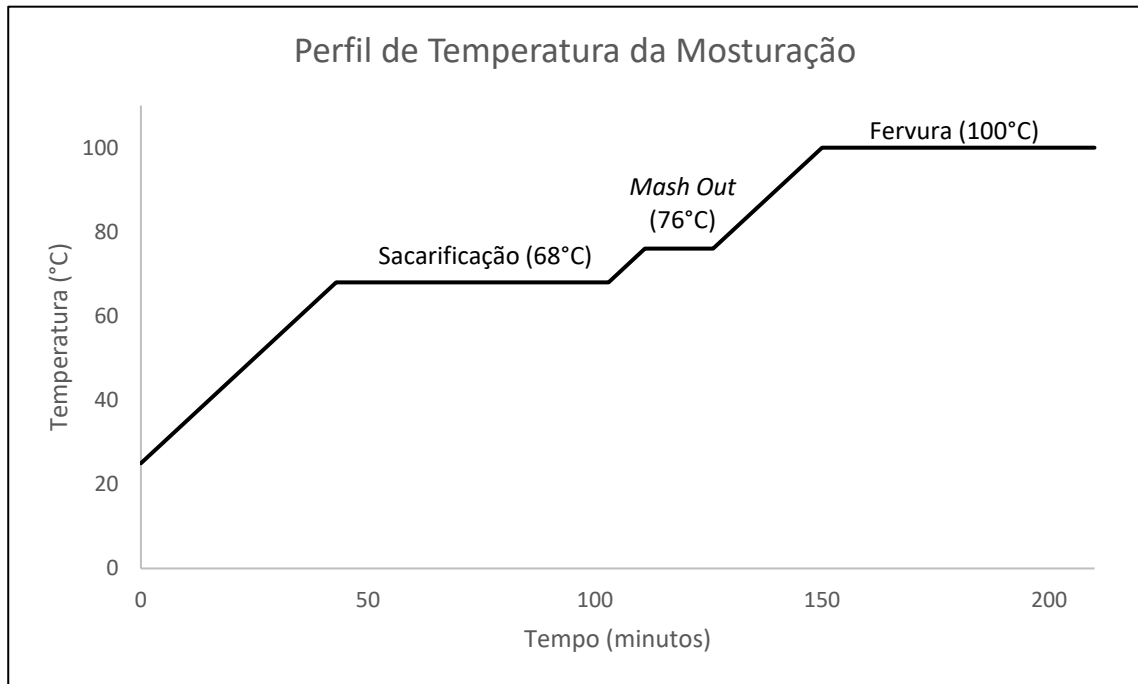
Ingredientes	Quantidade
Água	73 litros
Malte Pilsen Uma Malta	6 kg
Malte Viena Uma Malta	6 kg
Lúpulo Citra	35 g
Lúpulo SAAZ	35 g
Fermento Belle Saison Lallemand	33 g
Adjuntos	
Cloreto de Cálcio	10,4 g
Sulfato de Cálcio	9,0 g
Protect Plus	4,5 mL
Enzima β -glucanase	2,4 g

Fonte: Autor (2023)

4.4 PRODUÇÃO DA CERVEJA BASE

Ao tanque de mosturação foram adicionados 33 litros de água, o cloreto e o sulfato de cálcio, o neutralizador de cloro e a β -glucanase. A água foi aquecida até 55°C, ponto onde os 12 kg de malte moído foram adicionados ao tanque e mantido sob agitação até atingir a temperatura de sacarificação de 68°C. O mosto foi mantido nessa temperatura por 60 minutos, até a total transformação enzimática do amido em açúcares fermentáveis, confirmado pelo teste de iodo negativo. Na sequência o mosto foi aquecido até 75°C e mantido nessa temperatura por 15 minutos para a inativação enzimática.

Figura 3 - Perfil de temperatura da mosturação da cerveja base.



Fonte: Autor (2023)

Após a inativação enzimática foi realizada a recirculação manual do mosto para a formação da cama de malte, a filtração das partículas finas em suspensão e clarificação do mosto. Após atingir a clarificação desejada, o mosto foi transferido para o tanque de fervura concomitantemente com a lavagem do malte. Foram utilizados 40 litros de água previamente aquecida até 75°C para a extração dos açúcares ainda retidos na cama de malte. O mosto foi então aquecido até atingir a fervura e mantido em ebulição por 60 minutos. No início da etapa de fervura foram adicionados 35 g de lúpulo Citra (lúpulo de amargor) e, após 45 minutos, foram adicionados mais 35 g de lúpulo SAAZ (lúpulo de aroma/sabor). Após os 60 minutos de fervura o mosto foi resfriado com o uso de um *chiller* de imersão de alumínio até atingir a temperatura de 30°C, passou pelo processo de *wirlpool* para a decantação do *trub* e foi transferido para o fermentador de modo a não conter o resíduo depositado no fundo do tanque de fervura. Ao fermentador foram adicionadas 33 g de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae* do tipo Belle Saison da marca Lallemand) previamente reidratadas de acordo com as instruções do fabricante.

A densidade do mosto foi medida antes e após a etapa de fervura com o uso de densímetro apresentando a densidade de 1,047 g/cm³ pré-fervura e atingindo a densidade de 1,056 g/cm³ pós-fervura, densidade inicial da fermentação. O mosto foi então fermentado na temperatura de 20°C por 11 dias e a densidade atingiu 1,009 g/cm³. Após 11 dias a temperatura

do mosto foi reduzida para 7°C e o mosto foi mantido nessa condição por 3 dias, quando o produto fermentado (cerveja base) foi transferido para dois fermentadores.

4.5 PRODUÇÃO DA CERVEJA CONTROLE E COM ADIÇÃO DE FRUTA

Após o processo de fermentação da cerveja base, a bebida foi dividida em dois fermentadores para o processo de Maturação. Ao primeiro fermentador foram acondicionados apenas 22 litros da cerveja base (controle) e no segundo fermentador foram acondicionados, além dos 22 litros da cerveja base, 2,2 kg de polpa de amora-preta (com fruta), o que corresponde à uma proporção de fruta de 9% na bebida final. A adição da fruta na etapa de maturação teve o objetivo de evitar a degradação de compostos presentes na fruta que afetariam as características sensoriais da bebida final (Moreno *et al.*, 2022). Em especial a fração de antocianinas é especialmente sensível à temperatura e sofre uma alteração de coloração quando aquecida (Jahn *et al.*, 2020).

A polpa de amora foi separada em sua fase sólida (bagaço) e fase líquida (suco) com o uso de uma peneira. O bagaço foi acondicionado em dois tubos para Dry-Hop para limitar a dispersão das partículas maiores da fruta (cascas) na cerveja, mas permitir o contato e a difusão dos compostos provenientes do bagaço da fruta para a cerveja. Já o suco da fruta foi adicionado diretamente na cerveja. Os fermentadores com as cervejas controle e com adição de fruta foram então acondicionados para maturação na temperatura de 6°C por 15 dias e o processo de clarificação foi realizado nos três últimos dias de maturação, utilizando sílica, com a finalidade promover a decantação de partículas em suspensão e diminuição da turbidez da cerveja.

Após a maturação, uma alíquota da cerveja controle e uma da cerveja com adição de fruta foram coletadas e congeladas para análise posterior. A bebida foi transferida para barris de inox do tipo post-mix onde foi carbonatada com a injeção de CO₂ (2,5 L de CO₂/L_{cerveja} v/v) e posteriormente envasada em garrafas de vidro.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS

Amostras foram tomadas em pontos distintos da produção da cerveja, acondicionados em tubos Falcon e congeladas para análise posterior. Foram analisadas amostras do mosto base, da cerveja controle e da cerveja com fruta. Para cada amostra foram analisados os parâmetros de potencial da atividade antioxidante pelos métodos de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e redução do ferro (FRAP), o teor de antocianinas monoméricas totais, o

teor de compostos fenólicos totais, a acidez titulável, o pH, o teor de sólidos solúveis totais e a densidade relativa do líquido (Tabela 3). Apenas para a cerveja controle e a cerveja com fruta foram determinados o teor alcoólico e a coloração EBC.

Tabela 3 – Estruturação das análises físico-químicas para as quatro categorias de amostras analisadas.

	Polpa de Amora-Preta	Mosto Base	Cervejas	
			Controle	Com Fruta
pH	X	X	X	X
Acidez Titulável	X	X	X	X
Sólidos Solúveis Totais	X	X	X	X
Densidade Específica	X	X	X	X
Compostos Fenólicos Totais	X	X	X	X
Antocianinas Monoméricas Totais	X	X	X	X
Atividade Antioxidante:				
<i>DPPH</i>	X	X	X	X
<i>FRAP</i>	X	X	X	X
Cor			X	X
Teor Alcoólico			X	X

Fonte: Autor (2023)

4.6.1 Caracterização físico-química do mosto base e das cervejas controle e com fruta: pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, densidade específica e teor alcoólico.

4.6.1.1. pH

A determinação do pH segue a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.1.

4.6.1.2. Acidez titulável

A determinação da acidez titulável segue a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.2, com a diferença de que a titulação foi realizada diretamente, em duplicata, com 10 mL das amostras de cerveja controle, cerveja com fruta e mosto base.

4.6.1.3. *Sólidos Solúveis Totais*

A determinação do teor de sólidos solúveis totais segue a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.3.

4.6.1.4. *Densidade específica*

A determinação da densidade específica do líquido segue a mesma metodologia descrita no item 4.2.1.4.

4.6.1.5. *Teor Alcoólico*

O teor alcoólico foi estimado através da diferença das densidades original (SG_{orig}) e final, após a fermentação ($SG_{aparente}$), do mosto cervejeiro. O teor alcoólico expresso em % ABV (álcool por volume) foi calculado utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Teor Alcoólico} = [(SG_{original} - SG_{aparente}) \times 1,05 \times 100] / (SG_{aparente} \times 0,79) \quad (3)$$

4.6.2 **Determinação de Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas Monoméricas Totais**

4.6.2.1. *Compostos Fenólicos Totais*

A quantificação de compostos fenólicos totais segue a metodologia descrita no item 4.2.2.1 com a diferença de que para as amostras de mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta não foi realizada diluição prévia à preparação das amostras.

4.6.2.2. *Antocianinas Monoméricas Totais*

A determinação do teor de antocianinas monoméricas totais segue a metodologia descrita no item 4.2.2.2 com a diferença de que as amostras de mosto base, cerveja controle e

cerveja com fruta foram preparadas em uma diluição de 1:3 (100 µL de amostra e 200 µL de solução tampão).

4.6.3 Capacidade Antioxidante

4.6.3.1. DPPH

A determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) segue a metodologia descrita no item 4.2.3.1 com a diferença de que as amostras de mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta foram preparadas inicialmente para uma diluição de 1:10 (5 µL de amostra bruta e 45 µL de água destilada). As amostras diluídas iniciais passaram, então, por uma diluição seriada resultando em diluições de 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 e 1:100, seguindo o restante dos procedimentos. Para as amostras de mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta foram utilizados os resultados na diluição de 1:25.

4.6.3.2. FRAP

A determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP segue a metodologia descrita no item 4.2.3.2 com a diferença de que as amostras de mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta foram preparadas em uma diluição de 1:30 (10 µL de amostra e 290 µL de solução FRAP).

4.6.4 Determinação da Cor

A coloração da cerveja controle e da cerveja com fruta foi determinada de acordo com a metodologia da *European Brewery Convention* (Shellhammer, 2009). As amostras tiveram a absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm e 700 nm para confirmação da ausência de turbidez. Com o resultado do teste apresentando valor $A_{700} \leq 0,039 \times A_{430}$ a cerveja é considerada livre de turbidez e o resultado pode ser considerado válido e a cerveja não precisa passar por clarificação. O valor do índice de cor EBC das cervejas foi calculado de acordo com a fórmula:

$$EBC_{cor} = A_{430}(cela\ de\ 10\ mm) \times 25 \quad (6)$$

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a similaridade entre o mosto base, a cerveja controle e a cerveja com fruta para pH, Acidez Titulável, Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP foi realizada Análise de Variância com os dados sem transformação e teste de Tukey *post hoc*. Foi considerado a existência de diferença significativa quando os resultados indicaram valor de $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software PAST 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE AMORA-PRETA

Os resultados da caracterização físico-química da polpa de amora-preta estão apresentados na tabela 4. A polpa de Amora-preta produzida apresentou densidade específica de $1,047 \text{ g/cm}^3$ e concentração de Sólidos Solúveis Totais de 12 °brix. O valor do pH foi de $3,443 \pm 0,171$ e de acidez titulável foi de $1,418 \pm 0,011 \text{ g AC/100 mL}$, valores da mesma ordem de grandeza que os reportados por Ercisli e Orhan (2007) que avaliaram parâmetros físico-químicos de polpas de *M. nigra*, *M. rubra* e *M. alba* e reportam valores de pH entre 3,52 e 5,60 e de acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido cítrico, de 0,25 a 1,41%.

Tabela 4 - Caracterização da polpa de amora-preta com dados de sólidos solúveis totais e densidade específica, a média e desvio padrão das análises físico-químicas para pH, acidez titulável, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH.

Polpa de Amora-Preta	
Sólidos solúveis totais (°brix)	12
Densidade específica (g/cm ³)	1,047
pH	$3,443 \pm 0,171$
Acidez titulável (g AC/100mL)	$1,418 \pm 0,011$
Antocianinas monoméricas totais (mg C3G/L)	$380,108 \pm 35,824$
Compostos fenólicos totais (mg GAE/L)	$1380,384 \pm 21,662$
Atividade antioxidante – FRAP (mmol EqT/L)	$35,381 \pm 0,668$
Atividade antioxidante – DPPH (mmol EqT/L)	$19,125 \pm 0,682$

Fonte: Autor (2023)

Em contraste com os resultados de pH e acidez titulável, os resultados encontrados para os teores de antocianinas monoméricas totais ($380,108 \pm 35,825 \text{ mg C3G/L}$) na polpa de amora-preta analisada são mais baixos daqueles encontrados na literatura em outros estudos. Utilizando a mesma base metodológica, Özgen; Serçe e Kaya (2009), estudando frutos de *M. nigra* e *M. rubra*, encontraram teores de AMT de 571 e 98,8 mg C3G/kg respectivamente.

Enquanto, Donno *et al.* (2015), a partir de extração com metanol em meio ácido, encontraram teores de AMT em frutos de *Morus* spp. de 800,2 mg C3G/kg.

Com relação ao teor de compostos fenólicos totais ($1380,384 \pm 21,662$ mg GAE/L), os valores encontrados neste estudo estão abaixo daqueles descritos na literatura para frutos de amoras do gênero *Morus*. Estudos com amoras do gênero *Morus* cultivadas na Turquia encontraram teores de compostos fenólicos de 14220 mg GAE/kg para *M. nigra*, 10350 mg GAE/kg para *M. rubra*, e de 1810 mg GAE/kg para *M. alba* (Ercisli; Orhan, 2007). Por outro lado, Donno *et al.* (2015) estudaram frutas cultivadas na Itália e detectaram teores de compostos fenólicos de 2369,4 mg GAE/kg em frutas de *Morus* spp., enquanto Özgen; Serçe e Kaya (2009) encontraram teores de compostos fenólicos de 2737 e 1603 mg GAE/kg para *M. nigra* e *M. rubra*, respectivamente, em frutas cultivadas na Turquia, teores de compostos fenólicos que, apesar de serem maiores, são de uma ordem de grandeza similar aos encontrados neste estudo. Um ponto importante a se levar em conta é o fato de que, enquanto neste trabalho a análise foi realizada diretamente com a amostra das cervejas e da polpa de amora-preta, Özgen; Serçe e Kaya (2009) submeteram as amostras a um processo de extração com uma solução de acetona, água e ácido acético, diferentemente de Ercisli e Orhan (2007) que trabalharam com as frutas em pó e converteram os resultados finais para peso úmido. Tendo isso em perspectiva, esses teores maiores de compostos fenólicos podem ser explicados pelo fato de esses autores trabalharem com a fruta integral, enquanto as análises neste estudo foram realizadas com a fase líquida da polpa que apresenta uma concentração menor dos compostos analisados do que na casca da fruta. Além disso, o período de congelamento das frutas antes do preparo da polpa pode ter acarretado uma oxidação dos compostos fenólicos presentes no fruto e acarretado uma redução desses compostos ao longo do tempo de armazenamento, já que as frutas não sofreram nenhum tratamento para inativação enzimática.

Um outro fator que pode contribuir para os resultados diferentes é a questão do *Terroir* e das condições de cultivo. A variedade do cultivar da planta e a espécie (Ercisli; Orhan, 2007; Gundogdu *et al.*, 2011), a altitude (Paunović; Mašković; Milinković, 2022), estágio de maturação (Saensouk *et al.*, 2022; Yongram *et al.*, 2022), densidade da fruta (Wang *et al.*, 2023), são todas características que vão determinar variações nas características físico-químicas das frutas e na composição de compostos bioativos presentes. Dessa forma, é importante ter a determinação da composição da matéria-prima utilizada na formulação de bebidas com a adição de frutas, de forma a considerar a incorporação no produto final dos compostos bioativos presentes nos ingredientes utilizados.

Quando se compara a amora do gênero *Morus* com outras frutas, pode-se observar que as frutas vermelhas apresentam os maiores teores de antocianinas e de compostos fenólicos, o que promove uma maior capacidade antioxidante pela ação desses compostos. Donno *et al.* (2015) investigaram 8 frutas diferentes: Amora (*Morus* spp., no inglês: *Mulberry*), Maçã, Amora (*Rubus* spp., no inglês *Blackberry*), Groselha preta, Mirtilo, Laranja, Framboesa e Morango. Mirtilo e Groselha apresentaram os maiores teores de antocianinas (2306,3 e 2252,2 mg C3G/kg, respectivamente), tendo a Groselha apresentado os maiores valores para teores de compostos fenólicos (4344,3 mg GAE/kg) e de atividade antioxidante (76,86 mmol Fe₂₊/kg). Esses valores são 2,8 vezes maiores que os encontrados para Amora (*Morus* spp.) com relação aos teores de antocianinas, 1,8 vezes maiores para os teores de compostos fenólicos (2369,4 mg GAE/kg) e de 3,47 vezes maior para capacidade antioxidante (22,12 mmol Fe₂₊/kg). Entretanto, quando comparados com outras frutas investigadas, como maçã, laranja e framboesa (5,62, 12,43 e 13,02 mmol Fe₂₊/kg de capacidade antioxidante respectivamente), os resultados de capacidade antioxidante para *Morus* spp. são maiores de 3,9 a 1,7 vezes, demonstrando que a Amora tem potencial como ingrediente para incorporação de compostos bioativos e aumento da capacidade antioxidante em produtos alimentícios e bebidas (Donno *et al.*, 2015).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS

A caracterização físico-química do mosto base, da cerveja controle e da cerveja com fruta são apresentados na tabela 5. De acordo com a legislação brasileira as duas cervejas produzidas são classificadas como cervejas puro malte, pois 100% do extrato primitivo no mosto é originário de cevada malteada e as cervejas possuem um teor alcoólico maior que 2% ABV (Brasil, 2019). Com relação ao estilo Saison, as cervejas produzidas no estudo não se enquadraram em todas as características do estilo determinadas pelos guias consultados. A densidade específica da cerveja final ultrapassou o limiar superior de 1,008 g/cm³ determinado pelos guias de estilo BJCP e BA alcançando 1,009 g/cm³, tanto para a cerveja controle, como para a cerveja com fruta, as outras características se apresentaram em conformidade com a descrição dos guias (Brewers-Association, 2022; Strong; England, 2021). Essa diferença pode ser resultado da formação de açúcares não-fermentáveis durante a sacarificação do amido na etapa de mosturação e que não foram metabolizados pelas leveduras durante a fermentação. O consumo dos açúcares presentes no mosto pelas leveduras é o que reduz a densidade do mosto inicial para a cerveja finalizada. Essa diferença é relativa à formação de etanol durante a fermentação dos açúcares realizada pelas leveduras. A densidade da água é o padrão de

comparação (1.00293 g/cm³ a 25°C), a densidade do álcool etílico é de 0,789 g/cm³ a 20°C (Jacobs *et al.*, 2022) e a densidade da maltose, principal dissacarídeo formado durante a sacarificação do amido na mosturação, é de 1,51956 g/cm³ a 24,85°C (Lourdin; Colonna; Ring, 2003).

Tabela 5 - Caracterização físico-química do mosto base, da cerveja controle e da cerveja com fruta, apresentando resultados para sólidos solúveis totais, densidade específica, pH, acidez titulável, teor alcoólico (ABV) e cor da cerveja controle e cerveja com fruta, antocianinas monoméricas totais para a cerveja com fruta e caracterização básica do estilo Saison nos guias de estilo da BJCB (¹) e BA (²). Para pH, acidez titulável e antocianinas monoméricas totais são apresentados valores médios e desvio padrão. Letras diferentes em sobrescrito indicam diferença significativa em análise de variância com p<0,05. (OG – Gravidade original; FG – Gravidade final).

	Mosto base	Cerveja controle	Cerveja com fruta	Estilo Saison
Sólidos solúveis totais (°brix)	14	10	10	-
Densidade específica (g/cm ³)	1,056	1,009	1,009	OG:1,048-65 ¹ FG:1,002-8 ¹ OG:1,040-60 ² FG: 1,004-8 ²
pH	5,153 ± 0,151 ^a	4,388 ± 0,014 ^b	4,149 ± 0,005 ^c	-
Acidez titulável (g AC/100mL)	0,495 ± 0,007 ^a	0,759 ± 0,014 ^b	0,989 ± 0,068 ^c	-
ABV (%)	-	6,19	6,06	5-7 ¹ 5-6,8 ²
Cor (EBC)	-	21	51	9-27 ¹ 6-14 ²
Antocianinas monoméricas totais (mg C3G/L)	-	-	3,056 ± 0,377	-

Fonte: Autor (2023)

No início do processo de fermentação, a levedura adicionada ao mosto passa por uma fase de multiplicação celular onde, uma parte do açúcar presente será consumido por respiração aeróbica produzindo uma rápida multiplicação das células de leveduras até que o oxigênio dissolvido presente no mosto seja completamente consumido. No ambiente anaeróbico subsequente, as leveduras cervejeiras cessam a sua multiplicação e iniciam um processo de manutenção de seu metabolismo através de fermentação alcoólica. Dessa forma os açúcares fermentescíveis, responsáveis pela alta densidade do mosto cervejeiro, são consumidos e metabolizados com a formação de álcool etílico e CO₂ como subprodutos principais (Briggs *et al.*, 2004).

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de alternar entre a respiração aeróbica e anaeróbica em seu metabolismo de carboidratos. A maltose, principal dissacarídeo no mosto cervejeiro (50-60%) (Blanco *et al.*, 2014), será clivada em duas moléculas de glicose que então entram na rota da glicólise até a formação de duas moléculas de piruvato para cada molécula de glicose. Nesse ponto, se há a presença de oxigênio, as moléculas de piruvato entram no ciclo do ácido cítrico produzindo uma quantidade de 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose inicial. Se não há oxigênio disponível, as leveduras são capazes de metabolizar o piruvato pela rota de fermentação alcoólica, que produz uma quantidade muito menor de ATP, apenas 4 moléculas de ATP por molécula de glicose inicial (Belitz; Grosch; Schieberle, 2009). Essa diferença na quantidade de energia disponibilizada pelos dois processos é o que explica a interrupção na multiplicação celular, processo com alta demanda energética, após o consumo de oxigênio disponível no mosto cervejeiro.

O acúmulo de etanol produzido como um produto da fermentação alcoólica é o que promove a redução da densidade final da cerveja produzida. O teor alcoólico das cervejas alcançou 6,19 %ABV e 6,06 %ABV para a cerveja controle e a cerveja com adição de fruta, respectivamente. As duas cervejas foram produzidas com o mesmo mosto base, mas a diluição do mosto base com a polpa de fruta resultou em uma densidade inicial para a fermentação de 1,055 g/cm³ para a cerveja com adição de fruta, o que resultou num teor alcoólico menor do que a cerveja controle. Com a diluição do mosto, tendo em vista a densidade específica de 1,047 g/cm³ da polpa de fruta adicionada, a concentração final de álcool na cerveja com fruta foi 0,13 %ABV menor do que o controle.

A coloração da cerveja controle foi de 21 EBC, o que corresponde ao estilo descrito nos dois guias de estilos (BJCP e BA). A cerveja com fruta apresentou coloração de 51 EBC, com coloração púrpura-avermelhada, resultado da incorporação de pigmentos provenientes da fruta (Antocianinas), o que se enquadra no estilo, pois a coloração de uma *fruit beer* é determinada

pelo estilo base e o tipo de fruta adicionada, não existindo uma faixa de coloração EBC definida, devido à grande variação possível de coloração final.

Os valores de pH e acidez titulável no mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta apresentaram resultados que refletem as características do processo fermentativo e da incorporação da polpa de amora-preta na cerveja com fruta. Observa-se uma redução do pH e um aumento na acidez entre a cerveja com fruta e a cerveja controle, resultado da incorporação da polpa de amora-preta (pH de $3,433 \pm 0,171$ e acidez titulável de $4,539 \pm 0,034$ g AC/100mL). O pH é resultado direto da presença de moléculas com a capacidade de serem aceptoras de elétrons e é expressa como uma relação inversa da concentração de cátions H^+ na solução (ácidos). Quanto maior a quantidade de moléculas aceptoras de elétrons na solução, menor será o valor do pH. Isso reflete a acidez de uma solução, já que as moléculas aceptoras de elétrons são consideradas como ácidos de Lewis, uma solução com grande quantidade de ácidos é uma solução com grande acidez e vice-versa. Dessa forma, o pH e a acidez possuem uma relação inversamente proporcional, quando maior a acidez, menor será o pH de uma solução. Essa relação inversa foi observada nos resultados de pH e acidez para as amostras de mosto base, cerveja controle e cerveja com fruta, onde uma acidez maior foi refletida por um pH menor, sendo a cerveja com fruta apresentando o menor pH e maior acidez e o mosto base o maior pH e a menor acidez. Os resultados da análise de variância e do teste de Tukey identificaram diferença significativa entre as amostras com um valor de $p < 0,05$, evidenciando que o processo fermentativo em si reduz o pH e aumenta a acidez da cerveja, assim como evidencia que a elevada acidez da polpa de fruta influenciou o aumento da acidez e redução do pH da cerveja com fruta em relação ao controle. Este comportamento está associado à formação de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo do mosto cervejeiro e à incorporação dos ácidos orgânicos provenientes da polpa de fruta, ocasionando o aumento da acidez da cerveja com fruta em relação à cerveja controle.

5.3 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CERVEJAS

Observa-se que a composição da cerveja controle e da cerveja com fruta diferem em relação ao pH, à acidez relativa e cor, assim como em relação ao teor de antocianinas (tabela 5) e de compostos fenólicos totais (figura 4), o que está associado às modificações advindas da incorporação de polpa de amora-preta. No que se refere às antocianinas, a maior concentração destes compostos na cerveja com adição de polpa de amora quando comparada à cerveja

controle está associada à presença destes pigmentos na fruta. Dessa forma, toda a contribuição destes compostos na bebida final é proveniente da polpa de amora adicionada

Na cerveja com adição da polpa de amora o teor de antocianinas monoméricas totais foi de $3,056 \pm 0,377$ mg C3G/L, enquanto na polpa de amora-preta foi encontrado um teor de $380,108 \pm 26,868$ mg C3G/L (tabela 6). Esses valores indicam uma incorporação na bebida final de 8,84% das antocianinas monoméricas totais existentes na polpa de amora-preta adicionada à cerveja na bebida final. Estudando cervejas com fruta comerciais, Baigts-Allende *et al.* (2021) identificaram níveis de antocianinas monoméricas totais em cervejas com frutas vermelhas de 29,1 mg/L, cereja de 24,8 mg/L e 19,3 mg/L, pêssego de 27,1 mg/L e de framboesa de 34,2 mg/L de delphinidin-3-glucoside, valores de antocianinas em uma ordem de grandeza maior ao encontrado no presente estudo (as proporções de fruta nessas cervejas comerciais não foram apresentadas na publicação). Por outro lado, ao avaliarem cervejas com adição de outras frutas (não vermelhas), reportam valores menores de antocianinas variando de 4,25 mg/L, em uma cerveja com maçã, e 6,06 mg/L em uma cerveja com pêra (Baigts-Allende *et al.*, 2021), valores de antocianinas em níveis de grandeza similares ao encontrado no presente estudo. Além dessas, várias outras cervejas analisadas não apresentaram a detecção de antocianinas presentes, mesmo com a adição de frutas na sua formulação (Baigts-Allende *et al.*, 2021).

Tabela 6 - Teor de antocianinas monoméricas totais na polpa de amora-preta e na cerveja com adição de fruta e a proporção de antocianinas presentes na polpa de amora-preta incorporada na cerveja com adição de fruta.

	Antocianinas monoméricas totais
Polpa de amora-preta	$380,108 \pm 26,868$ mg C3G/L
Cerveja com Fruta	$3,056 \pm 0,377$ mg C3G/L
<i>Incorporação na cerveja</i>	8,84 %

Fonte: Autor, 2023.

A cerveja é uma bebida que possui atividade antioxidante em níveis variáveis e que dependem dos ingredientes utilizados e do seu processo produtivo, tendo um papel importante o seu teor de compostos fenólicos (Nardini; Garaguso, 2020; Tirado-Kulieva *et al.*, 2023). Os compostos fenólicos apresentam alta atividade antioxidante, que depende do número e da posição dos grupamentos hidroxilas e de seus radicais, assim como do pH que influencia a estrutura da molécula e sua reatividade com agentes oxidantes (Belitz; Grosch; Schieberle, 2009;

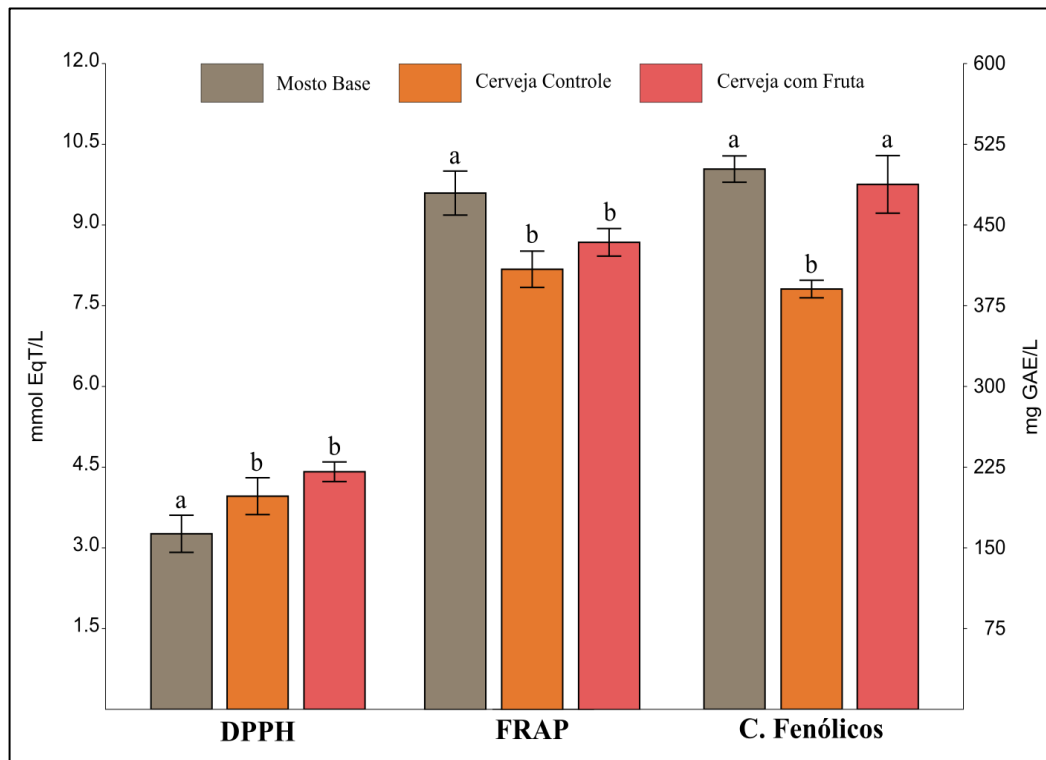
Rice-Evans; Miller; Paganga, 1997). Cabe ressaltar que de 70% a 80% dos compostos fenólicos presentes em cervejas são provenientes do malte e 20% a 30% são provenientes do lúpulo (Callemien; Collin, 2009). Outros ingredientes podem incorporar compostos fenólicos na bebida, sendo as frutas e seus derivados uma das fontes mais importantes destes compostos em cervejas dos diversos estilos de *fruit beers*, o que pode ser associado à maior atividade antioxidante destas bebidas quando comparadas a cervejas similares sem adição de fruta (Nardini; Garaguso, 2020). Uma maior atividade antioxidante promove um envelhecimento mais lento da bebida, já que o envelhecimento da cerveja está diretamente ligado a processos oxidativos (Zhao *et al.*, 2023).

No presente estudo, a adição de polpa de amora-preta à cerveja não promoveu um aumento significativo da atividade antioxidante (Figura 4), apesar do aumento do teor de compostos fenólicos totais de $390,508 \pm 8,333$ mg GAE/L para $487,731 \pm 27,304$ mg GAE/L da cerveja controle para a cerveja com fruta respectivamente ($p = 0,0002$). Esses valores são similares ao que pode ser encontrado na literatura para compostos fenólicos totais, tanto para cervejas sem adição de frutas como para *fruit beers* (Nardini; Garaguso, 2020). Gasiński, Alan *et al.* (2020) estudaram cervejas do estilo *Saison* sem adição de frutas e com a adição de suco ou a fruta integral de Espinheiro pontilhado (*Crataegus punctata*) e reportam teores de compostos fenólicos de 200,5 mg GAE/L para a cerveja controle, 279,6 mg GAE/L para a cerveja com fruta integral e de 410,1 mg GAE/L para a cerveja com suco de fruta, e identificaram um padrão de incorporação de compostos fenólicos provenientes das frutas similar ao encontrado neste estudo. Enquanto foram incorporados na cerveja final 77,47% dos compostos fenólicos identificados na polpa de amora-preta adicionada na bebida neste estudo, Gasiński, Alan *et al.* (2020) identificaram uma incorporação de 79,58% de CFT provenientes do suco de fruta e 30,03% provenientes da fruta integral, valores similares ao deste estudo, visto que a polpa de amora-preta foi adicionada ao fermentador em um contêiner-filtro de aço inox usado comumente para realização de *dry-hop* com o objetivo de minimizar a dispersão de partículas sólidas da casca da fruta para o líquido, o que se assemelha ao processo de adição de apenas o suco de fruta no estudo sendo comparado.

A cerveja com adição de polpa de amora apresentou atividade antioxidante de $8,685 \pm 0,261$ e $4,415 \pm 0,161$ mmol EqT/L respectivamente para os métodos FRAP e DPPH, enquanto a cerveja controle apresentou atividade antioxidante de $8,185 \pm 0,344$ e $3,961 \pm 0,303$ mmol EqT/L para os métodos FRAP e DPPH respectivamente. Essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa pela análise de variância ($p=0,15$ para o método FRAP e $p=0,17$ para o método DPPH) entre as duas cervejas, porém observa-se diferença significativa quando

se compara com os valores da atividade antioxidante do mosto. A atividade antioxidante do mosto base foi maior que da cerveja controle e da cerveja com fruta pelo método FRAP ($9,600 \pm 0,417$ mmol EqT/L valor de p de 0,0038 e 0,0118 com relação à cerveja controle e a cerveja com fruta respectivamente). Porém, quando analisada pelo método DPPH, a atividade antioxidante do mosto base apresentou valores menores ($3,262 \pm 0,304$ mmol EqT/L) do que a cerveja controle e a cerveja com fruta, com valor de p de 0,041 e 0,004 respectivamente.

Figura 4 - Potencial de Atividade Antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP (mmol EqT/L) e Teor de Compostos Fenólicos (mg GAE/L) para as amostras de Mosto base, Cerveja Controle e Cerveja com Fruta. As barras indicam média e intervalo de 95%, as letras indicam os resultados para análise de variância com diferença significativa entre as categorias com $p < 0,05$.



Fonte: Autor (2023)

Apesar do aumento significativo do teor de compostos fenólicos e da incorporação de antocianinas na cerveja com adição de polpa de amora, sugere-se que a adição de 9% de polpa de amora-preta não foi suficiente para agregar compostos com atividade antioxidante que promova alteração significativa na capacidade antioxidante da cerveja. Estes resultados indicam que a adição de uma proporção maior de polpa de fruta seria necessária para representar um real benefício à bebida em relação ao aumento da atividade antioxidante. Cho *et al.* (2018) estudaram o efeito da adição de diferentes proporções de polpa de caqui e compararam com a

cerveja sem adição da polpa e reportam um aumento da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais em função do aumento da concentração de fruta adicionada à cerveja. Na cerveja controle foi observado um teor de compostos fenólicos de 507,09 mg GAE/kg e uma atividade antioxidante de 80,12% de inibição de DPPH enquanto as cervejas com adição de polpa de caqui variaram de 595,66 a 714,11 mg GAE/kg e de 85,31% a 91% de inibição de DPPH para 50 g/10L e 200 g/10L de fruta em água, respectivamente (Cho *et al.*, 2018).

Castro Marin *et al.* (2021) produziram cervejas com a adição de mosto de uva em três concentrações diferentes e avaliaram o efeito desta incorporação sobre a concentração de compostos fenólicos. Os pesquisadores identificaram um aumento gradual na concentração de compostos fenólicos total da cerveja controle (274 mg GAE/L) para a cerveja com adição de 20% de mosto de uva (338 mg GAE/L). Esse comportamento demonstra que a concentração de polifenóis em cervejas com adição de fruta está diretamente relacionada com a proporção de fruta adicionada. Uma adição maior de fruta pode, portanto, proporcionar uma maior incorporação de compostos fenólicos, antocianinas e outras substâncias bioativas refletindo em uma maior atividade antioxidante na cerveja final. Zapata *et al.* (2019) estudaram o comportamento da atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos durante a maturação de cervejas do estilo American Amber Ale com adição de 10% de frutas de três cultivares de marmelo. Os autores relatam ter observado diferença significativa apenas na quantidade de polifenóis que foi maior nas cervejas com fruta em relação ao controle, mas não encontraram diferença na atividade antioxidante entre as cervejas com fruta e o controle. Este comportamento foi também observado no presente estudo.

A etapa do processo em que se realiza a adição da fruta pode também influenciar a eficiência da extração de compostos fenólicos e interferir na atividade antioxidante da cerveja final (Ducruet *et al.*, 2017; Yang; Gao, 2021). Estudando a adição de Goji em diversas etapas do processo produtivo de uma cerveja, Ducruet *et al.* (2017) observaram que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante apresentaram maiores valores nas cervejas em que as frutas foram adicionadas durante a fervura do que naquelas em que a adição ocorreu durante a fermentação primária ou na maturação. Durante a mosturação ocorre a extração, em temperaturas abaixo das de sacarificação, de compostos fenólicos presentes no malte, assim como a formação de melanoidinas resultado da reação de Mailard, e que contribuem para um aumento da capacidade antioxidante do mosto (Yang; Gao, 2021). Por outro lado, durante a etapa de fervura do mosto ocorre a redução do teor de compostos fenólicos e um aumento na concentração de melanoidinas, processos associados à degradação térmica e a reação de Mailard, respectivamente. Estas modificações na composição do mosto promovem um aumento

na atividade antioxidante, porém, a alta temperatura utilizada neste processo e o tempo (muitas vezes superior a 60 minutos) também promove a produção de uma grande quantidade de radicais livres que reagem com os compostos antioxidantes produzidos (Zhao *et al.*, 2023). Em cervejas onde a adição de frutas é realizada durante a fervura, ou mosturação, podem ocorrer dois processos, de alguma forma antagônicos, se por um lado observa-se um aumento da extração de compostos fenólicos e outros compostos bioativos, também ocorre a degradação térmica destes devido à alta temperatura utilizada nesta etapa do processo.

Neste sentido, as antocianinas são particularmente suscetíveis aos danos de radicais livres e são facilmente oxidadas, perdendo suas características bioativas e, também, alterando sua coloração (Santos-Buelga; González-Paramás, 2018). Essas características ganham relevância em cervejas estilo *Fruit Beer*, onde frutas adicionadas contêm esses pigmentos na sua composição, por exemplo amora, açaí, ameixa, jabuticaba, jabolão, cereja, figo, framboesa, uva, maçã, morango e acerola, entre outras. Dessa forma, na produção de *Fruit beers*, é importante que seja avaliada a etapa mais adequada para a adição destas frutas de modo a maximizar a extração de compostos bioativos promovendo um aumento da capacidade antioxidante da cerveja final, em equilíbrio com as características sensoriais, de cor, sabor e aroma desejadas de modo a determinar a formulação ideal do produto final.

6 CONCLUSÃO

A polpa de amora-preta produzida apresentou um teor de compostos fenólicos totais em um nível de grandeza similar à outras frutas vermelhas já estudadas e descritas na literatura, mas em quantidades menores do que já foi descrito para frutas do gênero *Morus*. De forma similar, o teor de antocianinas monoméricas totais da polpa de amora-preta também apresentou valores elevados, mas abaixo do que é descrito na literatura para *Morus nigra*.

As cervejas produzidas se enquadraram no estilo *Saison* como descrito pelos guias BA e BJCP, com exceção de extrapolarem, no limite superior do estilo, a densidade específica final da bebida. A cerveja com fruta apresentou teor alcoólico menor e coloração mais intensa do que a cerveja controle, resultado da adição da polpa de amora-preta e incorporação de pigmentos da fruta na bebida final.

A cerveja com adição de fruta apresentou um teor de compostos fenólicos maior do que a cerveja controle, sem adição da fruta, assim como apresentou antocianinas em sua composição, substâncias que são inexistentes na cerveja controle sem a adição da fruta. Esses dois tipos de compostos estão presentes em altas quantidades na polpa de amora-preta, o que demonstra que essa fruta tem potencial para ser utilizada como fonte de compostos fenólicos e antocianinas na produção de cervejas. A adição de polpa de amora-preta à cerveja durante a etapa de maturação da bebida não acarretou um aumento significativo na atividade antioxidante da cerveja produzida com a adição de fruta em relação a cerveja controle.

Novos estudos com diferentes proporções de fruta em relação ao mosto base e investigando em qual etapa do processo produtivo há maior efetividade de extração de compostos fenólicos e antocianinas da polpa de fruta para a cerveja são necessários para determinar a proporção de fruta e a etapa de adição da fruta ideal durante o processo produtivo de modo a potencializar o efeito sobre a atividade antioxidante da bebida final.

REFERÊNCIAS

- BAIGTS-ALLENDE, Diana K.; PÉREZ-ALVA, Alexa; RAMÍREZ-RODRIGUES, Melissa A.; PALACIOS, Adriana; RAMÍREZ-RODRIGUES, Milena M. A comparative study of polyphenolic and amino acid profiles of commercial fruit beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, 100, p. 103921, 2021.
- BELCAR, Justyna; GORZELANY, Józef. Feasibility of Defatted Juice from Sea-Buckthorn Berries (*Hippophae rhamnoides* L.) as a Wheat Beer Enhancer. **Molecules**, 27, n. 12, p. 3916, 2022.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 1114 p. 978-3-540-69934-7.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239, n. 1, p. 70-76, Jul 15 1996.
- BLANCO, C. A.; CABALLERO, I.; BARRIOS, R.; ROJAS, A. Innovations in the brewing industry: light beer. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 65, n. 6, p. 655-660, Sep 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 (MAPA). Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2009.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 (MAPA). Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2019.
- BRASIL. **Anuário da cerveja: 2021**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária., 2022. 36 p. 978-85-7991-161-3.
- BREWERS-ASSOCIATION. **Brewers Association 2022 Beer Style Guidelines**. Brewers Association, 2022.
- BRIGGS, Dennis E.; BOULTON, Chris A.; BROOKES, Peter A.; STEVENS, Roger. **Brewing Science and Practice**. Cambridge-Boca Raton: Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2004. 1-85573-906-2.
- CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Structure, Organoleptic Properties, Quantification Methods, and Stability of Phenolic Compounds in Beer—A Review. **Food Reviews International**, 26, n. 1, p. 1-84, 2009.

CASTRO MARIN, Antonio; BARIS, Federico; ROMANINI, Elia; LAMBRI, Milena; MONTEVECCHI, Giuseppe; CHINNICI, Fabio. Physico-Chemical and Sensory Characterization of a Fruit Beer Obtained with the Addition of Cv. Lambrusco Grapes Must. **Beverages**, 7, n. 2, p. 34, 2021.

CHO, J. H.; KIM, I. D.; DHUNGANA, S. K.; DO, H. M.; SHIN, D. H. Persimmon fruit enhanced quality characteristics and antioxidant potential of beer. **Food science and biotechnology**, 27, n. 4, p. 1067-1073, Aug 2018.

CUNHA, Admilson Costa da; LOPES, Natália Drumond; BARCIA, Milene Teixeira; SAUTTER, Cláudia Kaehler; AUGUSTO BALLUS, Cristiano. Production and characterization of craft beers with different additions of native fruits and agro-industrial residues: a review. **Ciência Rural**, 53, n. 9, 2023.

DONNO, D.; CERUTTI, A. K.; PRGOMET, I.; MELLANO, M. G.; BECCARO, G. L. Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. **Food Research International**, 69, p. 179-188, 2015.

DUCRUET, J.; REBENAQUE, P.; DISERENS, S.; KOSINSKA-CAGNAZZO, A.; HERITIER, I.; ANDLAUER, W. Amber ale beer enriched with goji berries - The effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food Chemistry**, 226, p. 109-118, Jul 1 2017.

ERCISLI, Sezai; ORHAN, Emine. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

GASIŃSKI, A.; KAWA-RYGIELSKA, J.; SZUMNY, A.; CZUBASZEK, A.; GAŚSIOR, Justyna; PIETRZAK, W. Volatile Compounds Content, Physicochemical Parameters, and Antioxidant Activity of Beers with Addition of Mango Fruit (*Mangifera Indica*). **Molecules**, 25, n. 13, p. 3033, 2020.

GASIŃSKI, Alan; KAWA-RYGIELSKA, Joanna; SZUMNY, Antoni; GAŚSIOR, Justyna; GŁOWACKI, Adam. Assessment of volatiles and polyphenol content, physicochemical parameters and antioxidant activity in beers with dotted hawthorn (*Crataegus punctata*). **Foods**, 9, n. 6, p. 775, 2020.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *In*: WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E., *et al* (Ed.). **Handbook of Food Analytical Chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. v. 2, cap. F1.2, p. 19-31.

GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; SENSOY, R. I. Gazioglu; YILMAZ, H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. **Scientia Horticulturae**, 132, p. 37-41, 2011.

HABSCHIED, Kristina; ŽIVKOVIĆ, Antonio; KRSTANOVIĆ, Vinko; MASTANJEVIĆ, Krešimir. Functional Beer—A Review on Possibilities. **Beverages**, 6, n. 3, p. 51, 2020.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David A.T.; RYAN, Paul D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, 4, n. 1, p. 9, 2001.

IATTICI, Fabrizio; CATALLO, Martina; SOLIERI, Lisa. Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. **Beverages**, 6, n. 1, p. 3, 2020.

IMAIZUMI, Vitor Massami; FIGUEIRA, Ricardo; SARTORI, Maria Márcia Pereira; VENTIRINI-FILHO, Waldemar Gastoni. Caracterização físico-química e sensorial de *Fruit Beer* de jabuticaba desidratada. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 36, n. 2, 2020.

JACOBS, A.; WILLIAMS, D.; HICKEY, K.; PATRICK, N.; WILLIAMS, A. J.; CHALK, S.; MCEWEN, L.; WILLIGHAGEN, E.; WALKER, M.; BOLTON, E.; SINCLAIR, G.; SANFORD, A. CAS Common Chemistry in 2021: Expanding Access to Trusted Chemical Information for the Scientific Community. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 62, n. 11, p. 2737-2743, 2022.

JAHN, Alexander; KIM, Juyeong; BASHIR, Khawaja Muhammad Imran; CHO, Man gi. Antioxidant Content of Aronia Infused Beer. **Fermentation**, 6, n. 3, p. 71, 2020.

KAWA-RYGIELSKA, J.; ADAMENKO, K.; KUCHARSKA, A. Z.; PROROK, P.; PIORECKI, N. Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. **Food chemistry**, 281, p. 147-153, May 30 2019.

KUNZE, Wolfgang. **Technology Brewing and Malting**. Tradução PRATT, S. 3rd ed. Berlin: VLB Berlin, 2004. 946 p. 3-921690-49-8.

LAMUELA - RAVENTÓS, Rosa M. Folin - Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *In*: APAK, R.;CAPANOGLU, E., *et al* (Ed.). **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications**. 1 ed.: John Wiley & Sons, 2018. cap. 6, p. 107-115.

LIM, S. H.; CHOI, C. I. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, 11, n. 2, p. 437, 2019.

LIMA, Bianca de; PINTO, Ellen Porto; BRAVO, Claudia Eugênia Castro; MARCHI, João Francisco. Caracterização físico-química de cerveja Summer Ale adicionada de polpa de pitanga (*Eugenia uniflora*). **Brazilian Journal of Development**, 7, n. 3, p. 25337-25343, 2021.

LIMBERGER, Silvia Cristina. O setor cervejeiro no Brasil: gênese e evolução. **CaderNAU**, 6, n. 1, 2014.

LOURDIN, D.; COLONNA, P.; RING, S. G. Volumetric behaviour of maltose-water, maltose-glycerol and starch-sorbitol-water systems mixtures in relation to structural relaxation. **Carbohydrate Research**, 338, n. 24, p. 2883-2887, 2003.

MAQSOOD, M.; ANAM SAEED, R.; SAHAR, A.; KHAN, M. I. Mulberry plant as a source of functional food with therapeutic and nutritional applications: A review. **Journal of Food Biochemistry**, 46, n. 11, p. e14263, 2022.

MORENO, Skylar R.; CURTIS, Savanna J.; SARKHOSH, Ali; SARNOSKI, Paul J.; SIMS, Charles A.; DREYER, Eric; RUDOLPH, Arthur B.; THOMPSON-WITRICK, Katherine A.;

MACINTOSH, Andrew J. Considerations When Brewing with Fruit Juices: A Review and Case Study Using Peaches. **Fermentation**, 8, n. 10, p. 567, 2022.

NADERI, G. A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NIA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytotherapy Research**, 18, n. 5, p. 365-369, 2004.

NARDINI, M.; GARAGUSO, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. **Food Chemistry**, 305, p. 125437, 2020.

OLIVER, Garrett. **A mesa do mestre-cervejeiro: descobrindo os prazeres das cervejas e das comidas verdadeiras**. Tradução CLEAVER, A. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2012. 554 p. 978-85-396-0174-5.

ÖZGEN, Mustafa; SERÇE, Sedat; KAYA, Cemal. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**, 119, n. 3, p. 275-279, 2009.

PAIVA, R. A. M.; MUTZ, Y. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. A Review on the Obtaining of Functional Beers by Addition of Non-Cereal Adjuncts Rich in Antioxidant Compounds. **Antioxidants**, 10, n. 9, p. 1332, 2021.

PAUNOVIĆ, Svetlana M.; MAŠKOVIĆ, Pavle; MILINKOVIĆ, Mira. Antioxidant and Biological Activities of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Fruit Depending on Altitude. **Erwerbs-Obstbau**, 64, n. 4, p. 663-671, 2022.

PAWLOWSKA, Agata Maria; OLESZEK, Wieslaw; BRACA, Alessandra. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, p. 3377-3380, 2008.

RAIHOFER, L.; ZARNOW, M.; GASTL, M.; HUTZLER, M. A short history of beer brewing: Alcoholic fermentation and yeast technology over time. **EMBO Reports**, 23, n. 12, p. e56355, 2022.

RAMAPPA, Venkatesh Kumar; SRIVASTAVA, Devika; SINGH, Prashant; KUMAR, Umesh; KUMAR, Dinesh; GOSIPATALA, Sunil Babu; SAHA, Sudipta; KUMAR, Dhiraj; RAJ, Ritu. Mulberries: A Promising Fruit for Phytochemicals, Nutraceuticals, and Biological Activities. **International Journal of Fruit Science**, 20, n. sup3, p. S1254-S1279, 2020.

RICE-EVANS, Catherine; MILLER, Nicholas; PAGANGA, George. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

SAENSOUK, Surapon; SENAVONGSE, Rattavalee; PAPAYRATA, Chanakran; CHUMROENPHAT, Theeraphan. Evaluation of Color, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activities of Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) during Ripening. **Horticulturae**, 8, n. 12, p. 1146, 2022.

SANTOS-BUELGA, Celestino; GONZÁLEZ-PARAMÁS, Ana M. Anthocyanins. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Academic Press, 2018. p. 10-21.

SHELLHAMMER, Thomas H. Beer color. *In*: BAMFORTH, C. W. (Ed.). **Beer: A Quality Perspective**. San Diego: Academic Press, 2009. cap. 7, p. 213-227.

SICARD, D.; LEGRAS, J. L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, 334, n. 3, p. 229-236, Mar 2011.

SOUZA, G. R.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; DINIZ, T. C.; BRANCO, A.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; GUIMARAES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, M. G.; MORAES-FILHO, M. O.; COSTA, M. P.; PESSOA, C. O.; ALMEIDA, Jrgs. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, 78, n. 2, p. 248-254, May 2018.

STRONG, Gordon; ENGLAND, Kristen. **Beer Judge Certification Program 2021 Style Guidelines**. BJCP, 2021. 102 p.

SVEDLUND, N.; EVERING, S.; GIBSON, B.; KROGERUS, K. Fruits of their labour: biotransformation reactions of yeasts during brewery fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 106, n. 13-16, p. 4929-4944, 2022.

TIRADO-KULIEVA, V. A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, E.; MINCHAN-VELAYARCE, H. H.; PASAPERA-CAMPOS, S. E.; LUQUE-VILCA, O. M. A comprehensive review of the benefits of drinking craft beer: Role of phenolic content in health and possible potential of the alcoholic fraction. **Current Research in Food Science**, 6, p. 100477, 2023.

WANG, Kunhua; REN, Wenxin; JIA, Xiaoran; XING, Ying; WANG, Youte; WANG, Jun; XU, Huaide. Physicochemical properties and phytochemical components of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits with different density at harvest. **Journal of Food Composition and Analysis**, 117, p. 105113, 2023.

WEIGUO, Zhao; YILE, Pan; SHIHAI, Zhang Zhifang Jia; XUEXIA, Miao; YONGPING, Huang. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. **African Journal of Biotechnology**, 4, n. 6, p. 563-569, 2005.

WRIGHT, Olivia R. L.; PHAN, Anh Dao Thi; HONG, Hung Trieu; NETZEL, Gabriele; SULTANBAWA, Yasmina; NETZEL, Michael E. 2.06 - Bioactive Anthocyanins in Selected Fruits – A Foodomics Approach. *In*: CIFUENTES, A. (Ed.). **Comprehensive Foodomics**. Oxford: Elsevier, 2021. p. 77-104.

YANG, Dongsheng; GAO, Xuan. Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. **Trends in Food Science & Technology**, 110, p. 754-764, 2021.

YONGRAM, C.; PANYATIP, P.; SIRIPARU, P.; RATHA, J.; SUNGTHONG, B.; TADTONG, S.; PUTHONGKING, P. INFLUENCE OF MATURITY STAGE ON TRYPTOPHAN, PHENOLIC, FLAVONOID, AND ANTHOCYANIN CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Morus alba* L. FRUIT. **RASAYAN Journal of Chemistry**, 15, n. 03, p. 1693-1701, 2022.

ZAPATA, Pedro J.; MARTÍNEZ-ESPLÁ, Alejandra; GIRONÉS-VILAPLANA, Amadeo; SANTOS-LAX, David; NOGUERA-ARTIAGA, Luis; CARBONELL-BARRACHINA, Ángel A. Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. **LWT - Food Science and Technology**, 103, p. 139-146, 2019.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ZHAO, Xinyi; YIN, Yongqi; FANG, Weiming; YANG, Zhengfei. What happens when fruit married with beer? **International Journal of Gastronomy and Food Science**, 32, p. 100716, 2023.