

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Joana Gomes Magalhães

**Maturação de uma cerveja artesanal
em barrica de carvalho: Caracterização
química e sensorial**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo de Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Lucília Domingues
e do
Doutor Engenheiro Francisco Pereira

outubro de 2015

DECLARAÇÃO

Nome: Joana Gomes Magalhães

Título da dissertação: Maturação de uma cerveja artesanal em barrica de carvalho: Caracterização química e sensorial

Orientador/a/es:

Professora Doutora Lucília Domingues

Doutor Engenheiro Francisco Pereira

Ano de conclusão: 2015

Mestrado em Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Lucília Domingues pela ajuda, disponibilidade e por todas as sugestões essenciais para a realização desta dissertação.

Ao meu coorientador, Doutor Engenheiro Francisco Pereira e também ao Engenheiro Filipe Macieira pela disponibilidade, simpatia e por me terem proporcionado a oportunidade de fazer parte deste projeto.

Ao Engenheiro Eduardo Coelho por todo o conhecimento transmitido, pela ajuda, paciência, rigor e indicações fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos investigadores do Laboratório de Fermentações pela simpatia, auxílio e disponibilidade para qualquer ajuda necessária na realização de determinadas tarefas.

Aos meus pais, por me terem apoiado e incentivado incondicionalmente ao longo de todo o meu percurso académico, por acreditarem sempre em mim, pela paciência e ternura.

À minha irmã e ao meu cunhado, por me fazerem sempre acreditar que posso sempre fazer melhor, por me mostrarem que o trabalho e a dedicação compensam, por toda ajuda e motivação incansável ao longo de todo o percurso académico.

Às minhas amigas, Cátia, Louise, Adriana, Sara e Liliana por todos os momentos que passamos juntas durante estes 5 anos, pelo carinho, força, motivação e paciência.

Ao Nuno, o meu suporte, por estar sempre ao meu lado, por acreditar sempre em mim e me fazer sentir capaz, pela paciência e apoio incondicional.

Um profundo e sentido obrigado a todos vocês, sem os quais o sucesso deste projeto não seria possível!

RESUMO

Nos últimos anos, a produção de cerveja artesanal tem vindo a proliferar, conquistando espaço entre os apreciadores de cerveja e expandindo-se no mercado de bebidas alcoólicas.

Atualmente é possível encontrar no mercado uma vasta gama de cervejas com diferentes sabores, aromas, teores alcoólicos, entre outros fatores que têm influência direta na qualidade da cerveja obtida. Estas diferenças resultam da combinação de vários fatores, como sejam as matérias-primas utilizadas, o processamento, a embalagem e a maturação. Em particular, a maturação da cerveja utilizando barris de madeira pode proporcionar-lhe uma complexidade aromática única.

Assim, o objetivo deste trabalho focou-se na caracterização química e sensorial de cerveja artesanal maturada em barrica de carvalho, previamente utilizada no envelhecimento de Vinho do Porto, sendo que a informação resultante serviu como base para o desenvolvimento do produto final com vista à sua implementação no mercado.

Numa perspetiva microbiológica, foi possível detetar a presença de diferentes microrganismos, nomeadamente *Brettanomyces/Dekkera*, bactérias lácticas e acéticas, em algumas das cervejas maturadas em barrica. A identificação destes microrganismos foi correlacionada com a microflora característica da barrica e da presença das borras de Vinho do Porto anteriormente envelhecido nas mesmas.

A quantificação dos compostos maioritários indicou que as cervejas maturadas em barrica de carvalho apresentaram um teor alcoólico superior à da cerveja controlo. A análise de ácidos orgânicos evidenciou a presença de ácido tartárico, um ácido característico do vinho, nas cervejas maturadas em barrica, sendo um grande indicador da incorporação de compostos característicos de Vinho do Porto e da respetiva ação sobre as cervejas.

A análise dos compostos minoritários detetou a presença de compostos indicadores do envelhecimento em barricas de carvalho, tais como derivados de furanos, lactonas, eugenol, guaiacol, entre outros. Além disso, esta análise permitiu averiguar que as cervejas maturadas em barrica incorporaram compostos característicos do Vinho do Porto segundo o que era descrito na literatura, indo ao encontro dos perfis aromáticos detetados na análise sensorial. Alguns desses compostos são responsáveis por aromas descritos na análise sensorial.

Do processo de maturação em barrica de carvalho redundaram características complexas e únicas nas cervejas, transmitidas pelo carácter da madeira e/ou do Vinho do Porto.

Palavras-Chave: Cerveja artesanal, maturação, barrica de carvalho, Vinho do Porto.

ABSTRACT

In recent years, the production of craft beer has proliferated, becoming more popular between beer lovers and expanding in the alcoholic beverage market.

Nowadays it is possible to find on the market a wide range of beers with different flavors, alcohol levels, among other factors that have a direct influence on the quality of the beer produced. These differences result from the combination of several factors such as the raw materials used, the processing, packaging and maturation strategy. In particular, the beer maturation using oak barrels can give the beer a unique aromatic complexity.

Thereby, the objective of this work has focused on chemical and sensory characterization of craft beer aged in oak barrels, previously used in the aging Port Wine, and the resulting information will serve as a basis for the development of the final product in order of its implementation in the market.

In a microbiological perspective, it was possible to detect the presence of different microorganisms, including *Brettanomyces/Dekkera*, lactic and acetic bacteria in some of the matured beer in barrels. The identification of these microorganisms was correlated with the characteristics of the microflora of the barrel and the presence of Port Wine sediments in the previous aged barrels.

The quantification of the major compounds indicated that the beers aged in oak barrels have higher alcohol content than the beer control. The organic acid analysis showed the presence of tartaric acid, a characteristic acid in the wine in barrel aged beers, which is a great indicator of the presence of Port Wine sediments and respective action on the beers.

The analysis of minor compounds detected the presence of indicators of aging in oak barrels compounds such as furan derivatives, lactones, eugenol, guaiacol, among others. Also, this analysis allowed to ascertain that the beers aged in barrels incorporated characteristic compounds of Port Wine according to what was described in literature. Some of these compounds are responsible for aromas described in the sensory analysis.

From the maturation process in oak barrels resulted complex and unique features in beers, transmitted by the character of the wood and / or Port Wine.

Keywords: Craft beer, maturation, barrel oak, Port wine.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	XVI
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e objetivos do projeto.....	1
1.2 Apresentação da empresa.....	1
2 Fundamentos Teóricos.....	3
2.1 Cerveja.....	3
2.2 Matérias-primas utilizadas na produção da cerveja.....	4
2.2.1 Água.....	4
2.2.2 Malte.....	4
2.2.3 Cereais não maltados/Adjuntos.....	4
2.2.4 Lúpulo.....	5
2.2.5 Levedura.....	5
2.3 Processo de produção da cerveja.....	5
2.3.1 Maltagem.....	5
2.3.2 Produção e tratamento do mosto.....	6
2.3.3 Fermentação.....	8
2.3.4 Maturação.....	12
2.3.5 Operações de acabamento.....	12
2.4 Estabilidade de sabor da cerveja.....	13
2.4.1 Mecanismos de reação durante o processo de envelhecimento da cerveja.....	14
2.5 Cerveja em barrica de carvalho.....	15
2.6 Componentes da madeira: O efeito sobre o sabor da cerveja.....	16
2.6.1 Compostos derivados da madeira.....	17

2.7	Vinho do Porto	20
2.8	Processo de produção do Vinho do Porto	21
2.8.1	Aguardentação ou Benefício.....	22
2.8.2	Maturação/Envelhecimento	23
2.8.3	Mistura – <i>Blending</i>	23
2.9	Compostos Voláteis no Vinho do Porto.....	24
2.10	Métodos Analíticos	26
2.10.1	Análise de constituintes não-voláteis: HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) 26	
2.10.2	Análise de constituintes voláteis: GC-MS (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrography</i>) 26	
2.11	Análise sensorial	27
2.11.1	Testes sensoriais	28
2.11.2	Provadores	28
2.11.3	Ambiente da análise sensorial.....	28
3	Materiais e métodos.....	29
3.1	Amostras	29
3.1.1	Barricas.....	29
3.1.2	Formulação – <i>Blends</i>	30
3.2	Meios de cultura para identificação microbiológica.....	30
3.2.1	Meio DBDM (<i>Dekkera/Brettanomyces differential medium</i>)	30
3.2.2	Meio MRS (<i>deMan, Rogosa e Sharpe medium</i>).....	31
3.2.3	Meio YPM (<i>Yeast extract peptone mannitol medium</i>)	31
3.2.4	Meio YPD (<i>Yeast extract peptone medium</i>)	31
3.3	Quantificação dos compostos maioritários	31
3.4	Quantificação dos compostos minoritários	31
3.4.1	Extração dos compostos voláteis.....	31
3.4.2	GC-MS.....	32
3.5	Análise Sensorial	32

4	Apresentação e discussão dos resultados.....	34
4.1	Identificação microbiológica.....	34
4.2	Compostos majoritários.....	39
4.3	Compostos minoritários.....	41
4.4	Análise Sensorial.....	50
4.5	Compostos majoritários nos <i>blends</i>	54
4.6	Compostos minoritários nos <i>blends</i>	55
5	Conclusão	59
	Bibliografia	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo de produção de cerveja (adaptado de Wunderlich & Back, 2009).	6
Figura 2 – Relações entre as maiores classes de compostos aromáticos derivados do metabolismo da levedura (adaptado de Briggs <i>et al.</i> 2004).....	10
Figura 3 – Perfil do sabor da cerveja durante a estabilização (adaptado de Hernández-Artiga & Dolores, 2009).....	14
Figura 4 – Reações redox que promovem a estabilização de sabor (adaptado de Gresser, 2009b).	14
Figura 5 – Componentes do cerne da madeira e respetiva percentagem de massa (adaptado de Mosedale & Puech, 2003).....	16
Figura 6 – Sub-regiões da Região Demarcada do Douro (reproduzida de IVDP, 2015a).....	20
Figura 7 – Folha de prova apresentada ao painel no teste sensorial.....	33
Figura 8 – Identificação do crescimento de <i>Brettanomyces</i> , em meio de cultura DBDM, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.....	34
Figura 9 – Identificação do crescimento de bactérias lácticas, em meio MRS, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.	36
Figura 10 – Identificação de bactérias acéticas, em meio YPM, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.	37
Figura 11 – Identificação de leveduras, em meio de cultura YPD, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.....	38
Figura 12 – Teor de álcool final (% vol./vol.) no final do ensaio para todas as barricas e controlo.	39
Figura 13 – Concentração de ácidos orgânicos, tartárico, málico e láctico, no fim do período de estágio em barrica de carvalho nas diferentes barricas e controlo.	40
Figura 14 – Perfil de aparência de cada um dos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.	50
Figura 15 – Perfil aromático de cada um dos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.....	51
Figura 16 – Perfil de sabor de cada um dos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.....	52
Figura 17 – Perfil de qualidade de cada um dos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.	53

Figura 18 – Concentração de etanol (vol./vol.) nos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.	54
Figura 19 – Concentração de ácidos orgânicos nos <i>blends</i> analisados, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais compostos transferidos da madeira para a bebida alcoólica e efeitos sensoriais sobre a bebida (adaptado de Pérez-Juan & Castro 2015)	18
Tabela 2 – Descritores ou atributos de vinhos do Porto com mais citações (adaptado de Vilela <i>et al.</i> 2015)	25
Tabela 3 – Nomenclatura das amostras analisadas e respetivos processos, volumes e data de início de estágio	29
Tabela 4 – Nomenclatura dos <i>blends</i> e respetivas composições	30
Tabela 5 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) dos compostos voláteis minoritários detetados nas barricas e no controlo.....	43
Tabela 6 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) dos compostos voláteis minoritários detetados nos <i>blends</i> A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes e respetivos limites de deteção ($\mu\text{g/L}$)	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

DBDM – *Dekkera/Brettanomyces* differential medium

GC-MS – Gas chromatography-mass spectrum

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IVDP – Instituto dos Vinhos do Douro e Porto

LBV – Late Bottled Vintage

MRS – deMan, Rogosa e Sharpe medium

RI – Refraction Index

RPM – Rotações por minuto

UV – Radiação Ultravioleta

YPD – Yeast extract peptone dextrose medium

YPM – Yeast extract peptone manitol medium

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e objetivos do projeto

O presente projeto foi realizado no âmbito da realização da dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica pela Universidade do Minho, no ramo de Tecnologia Química e Alimentar, tendo sido desenvolvido no Centro de Engenharia Biológica em parceria com a empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações, Lda (2011), durante um período de seis meses.

Este projeto surge pela procura constante por parte da Fermentum em inovar, surpreendendo e cativando os consumidores, principalmente os mais exigentes e apaixonados por cervejas diferentes do usual. Sendo a principal motivação deste projeto, a obtenção de uma cerveja artesanal única em produção e em complexidade organolética, alcançada pelo conjunto de transformações derivadas da barrica de carvalho e das borras de Vinho do Porto nela existentes.

Posto isto, o objetivo principal consistiu na caracterização química e sensorial de uma cerveja artesanal maturada em barrica de carvalho, previamente utilizada no envelhecimento de Vinho do Porto, sendo que a informação resultante servirá como base para o desenvolvimento do produto final com vista à sua implementação no mercado.

1.2 Apresentação da empresa

A empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações, Lda é um *spin-off* da Universidade do Minho desde 2012, tendo como fundadores dois ex-alunos da Universidade do Minho que cursaram o Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, nomeadamente o Francisco Pereira e o Filipe Macieira. Esta empresa de base tecnológica, encontra-se sediada no concelho de Vila Verde desde Julho de 2013, no entanto a empresa em si começou a ser pensada aquando a realização do estágio relativo ao mestrado de Engenharia Biológica em 2008. Uma vez que os estágios de ambos os fundadores estavam relacionados com o mundo cervejeiro, o crescente interesse e a aquisição de fundamentos práticos, levaram à concretização de uma empresa focada na investigação e produção de cerveja artesanal. Desta forma, surgiu a Letra – Cerveja Artesanal Minhota, cujas cervejas artesanais produzidas utilizam ingredientes 100 % naturais, os quais lhe conferem atributos especiais e únicos. A substituição da etapa de filtração por uma etapa de decantação, e a retirada da etapa de pasteurização, etapas comuns na produção de

INTRODUÇÃO

cerveja industrial, contribuem para a intensificação e profundidade das características organoléticas. A nomenclatura das cervejas produzidas vai percorrendo o abecedário, sendo que no momento existem 4 cervejas base: a Letra A (*Weiss*), a Letra B (*Pilsner*), a Letra C (*Stout*) e a Letra D (*Red Ale*). Existem ainda duas cervejas especiais, nomeadamente a Letra E (*Belgian Dark*) e a Letra F (*India Pale Ale*).

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Cerveja

A cerveja é, provavelmente, uma das mais antigas realizações culturais da humanidade, remontando, pelo menos a 6000 a.C., tendo-se tornado uma das bebidas mais populares em todo o mundo. Foi fabricada há milhares de anos por acaso e desde então que tem vindo a ser produzida. Apesar dos grandes avanços tecnológicos que separam a cerveja produzida antigamente das cervejas produzidas nas indústrias atuais, o processo como um todo permanece bastante inalterado (Preedy, 2009).

Segundo a legislação portuguesa, entende-se a cerveja como sendo “a bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Sacharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável” (Portaria n.º 1/96).

De acordo com a associação Brewers Association (2014), a produção de cerveja em Portugal em 2013 foi superior a 720 m³ e a exportação superior a 240 m³, correspondendo a 3 % da produção total de cerveja. Em Portugal, durante o ano de 2013, o consumo *per capita* foi de 49 L e o número de cervejeiras ativas foi de oito, sendo que duas delas eram microcervejeiras.

Em todo o mundo são produzidos mais de 100 variedades de cerveja. As diferenças nos estilos de cerveja são baseadas nas combinações e relações entre vários fatores: as matérias-primas utilizadas, o processo de produção, a embalagem, o marketing e a cultura. Além disso, apesar de as cervejas serem semelhantes em estilo, a sua produção individual e a cultura circundante ajudam a definir a singularidade de cada cerveja, levando à existência de um vasto leque de tipos de cerveja (Papazian, 2006).

Na Europa, especialmente em Portugal, a cerveja artesanal foi recentemente introduzida e tem vindo a tornar-se num segmento de crescimento no setor de bebidas alcoólicas. As cervejas artesanais despertam a atenção dos consumidores pela diferença de sabores e aromas em relação às marcas habitualmente comercializadas, levando ao aumento da sua procura (Aquilani *et al.* 2015).

A cerveja artesanal é produzida a partir de ingredientes 100 % naturais, sem corantes nem conservantes. Importa realçar que a cerveja artesanal não é filtrada nem pasteurizada e o dióxido de carbono presente é derivado unicamente da fermentação alcoólica. A ausência quer da filtração quer da pasteurização permite a obtenção de uma cerveja mais turva que, apesar de ter um prazo de validade menor, é muito

mais intensa e aromática, preservando nutrientes importantes como vitaminas e sais minerais (Letra, 2014).

2.2 Matérias-primas utilizadas na produção da cerveja

As matérias-primas envolvidas no processo de produção de cerveja são, essencialmente, água, malte, cereais não maltados, lúpulo e levedura (Papazian, 2006).

2.2.1 Água

A água é o componente maioritário da cerveja, estando a qualidade do produto final diretamente relacionada à qualidade desse ingrediente. Como resultado, a água utilizada para o fabrico da cerveja deve corresponder à qualidade de água potável, deve ser límpida, incolor neutra em sabor e cheiro e deverá não conter metais pesados especialmente ferro e manganês (Esslinger & Narziss, 2003).

2.2.2 Malte

O malte é uma das matérias-primas fundamentais, obtido a partir da germinação, sob condições controladas, de grãos de cereal selecionado, geralmente, do grão da cevada ou de qualquer outro cereal, como milho, trigo ou aveia (Teixeira & Fonseca, 2007).

A cevada é o cereal mais utilizado pela sua composição rica em amido e enzimas (α -amilase e β -amilase) essenciais para a transformação do amido em açúcares que serão consumidos pelas leveduras, por possuir um teor moderado de proteínas responsáveis pela espuma, corpo e estabilidade coloidal, por serem fonte de aminoácidos e, por último, por proporcionar o sabor agradável da cerveja (Palmer, 2006).

2.2.3 Cereais não maltados/Adjuntos

Os cereais não maltados possuem propriedades que benéficamente complementam ou suplementam o malte de cevada, sendo frequentemente considerados fontes não maltadas de açúcares fermentescíveis. Os exemplos mais comuns de cereais não maltados utilizados são o arroz, o milho, a cevada e o trigo. A utilização destes cereais tem em vista a diminuição da percentagem de proteínas do mosto e o aumento do teor de açúcares, obtendo-se cervejas mais leves, com menos cor e com características específicas, em função da fonte de que provém (Stewart, 2006).

2.2.4 Lúpulo

O lúpulo, *Humulus lupulus L.*, é uma planta aromática com uma influência significativa na cerveja obtida. Meramente a inflorescência das flores femininas do lúpulo podem ser utilizadas na produção de cerveja, dado que as resinas de lúpulo, estão somente presentes nestas flores. As flores de lúpulo possuem pequenas glândulas, lupulinas, ricas em resinas de amargor, principalmente humulonas, e óleos essenciais (Roberts & Wilson, 2006).

Além disso, o lúpulo atua como um conservante natural, auxiliando na estabilidade microbiológica da cerveja e contribuindo para a formação de uma espuma de qualidade (Henning, 2006).

2.2.5 Levedura

Na produção de cerveja, a levedura utilizada por excelência é do género *Saccharomyces*. Este género apresenta várias espécies, sendo responsável pelo processo de fermentação da cerveja, transformando em condições anaeróbias os açúcares do mosto em etanol e dióxido de carbono (Russell, 2006).

A espécie e estirpe de levedura utilizada vai influenciar o aroma da cerveja, representando um parâmetro absolutamente decisivo para a qualidade do produto final. Consequentemente a levedura deve ser cuidadosamente selecionada e mantida com todas as suas características morfológicas, de floculação e de produção de aroma/gosto (Lewis & Young, 2002; Teixeira & Fonseca, 2007).

2.3 Processo de produção da cerveja

As principais fases do processo de produção de cerveja incluem, a maltagem, o fabrico e tratamento do mosto, a fermentação e por fim, as operações de acabamento. A Figura 1 representa, resumidamente, o esquema do processo de produção de cerveja.

2.3.1 Maltagem

A maltagem é a primeira fase do processo de produção da cerveja e consiste na passagem da cevada a malte através de 3 etapas fundamentais: molha, germinação e secagem (Kunze, 2004).

Durante a molha os grãos de cevada são colocados em contacto com a água durante dois dias, aumentando a humidade do grão e criando as condições para o início da germinação (Lewis & Young, 2002; Teixeira & Fonseca, 2007).

A germinação é um processo biológico que torna as paredes celulares do grão mais frágeis de modo a que o amido do grão se torne mais acessível, facilitando a sua extração. Durante a germinação são sintetizadas as enzimas necessárias para a hidrólise parcial dos componentes da cevada (amido, proteínas, paredes celulares) que dão origem aos nutrientes requeridos pela levedura (Lewis & Young, 2002; Teixeira & Fonseca, 2007).

O processo de germinação é interrompido no momento apropriado por um processo de secagem, com recurso a uma corrente de ar aquecido. A secagem vai, então, interromper as transformações enzimáticas, fixando as características do malte, o gosto e a coloração (Lewis & Young, 2002; Teixeira & Fonseca, 2007).

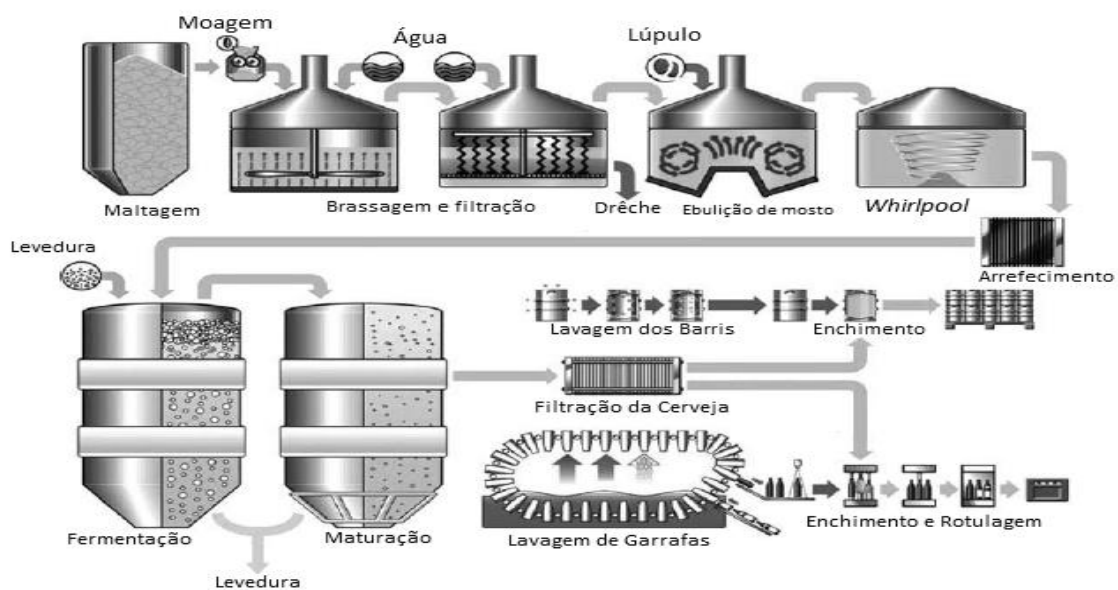


Figura 1 – Esquema do processo de produção de cerveja (adaptado de Wunderlich & Back, 2009).

2.3.2 Produção e tratamento do mosto

O processo de produção do mosto tem como finalidade a criação das condições necessárias para que ocorra a fermentação, convertendo os compostos inicialmente insolúveis do malte em substâncias solúveis. A formulação e dissolução destes compostos proporciona o ponto de partida para a fermentação do mosto (Kunze, 2004).

Moagem do malte

A moagem consiste no tratamento físico dos grãos do malte, onde o objetivo é a destruição da estrutura e tecidos do grão, de modo a melhorar a extração do amido e das proteínas durante a brassagem. O

malte deve ser cuidadosamente triturado, de forma a que as cascas sejam mantidas praticamente intactas, sendo depois usadas como material filtrante durante a filtração (Kunze, 2004).

Brassagem

A brassagem é o processo onde o malte moído e os cereais não maltados são misturados com água quente a temperaturas controladas. O objetivo deste processo é permitir que as enzimas contidas no malte degradem as proteínas e o amido a açúcares fermentescíveis e outros nutrientes. A partir desta ação enzimática obtém-se o chamado mosto ou extrato. Este procedimento pode ser monitorizado através da manipulação da temperatura, tempo e pH permitindo o controlo da atividade das enzimas (Kunze, 2004).

Filtração do mosto

No final do processo de brassagem, o produto resultante consiste numa mistura aquosa de substâncias dissolvidas e não dissolvidas. Assim, é necessário separar a parte solúvel, onde estão presentes todos os açúcares, chamado extrato ou mosto, da parte insolúvel, a drêche. Este processo de separação é denominado de filtração (Teixeira & Fonseca, 2007).

Ebulição do mosto

O mosto obtido do processo de filtração é transferido para uma caldeira de ebulição onde é colocado a altas temperaturas (Briggs *et al.* 2004).

Este processo tem várias funções, nomeadamente (Wunderlich & Back, 2009):

- 1) a evaporação da água em excesso para atingir a concentração desejada do mosto;
- 2) a esterilização do mosto;
- 3) a destruição das enzimas ainda presentes;
- 4) extração e transformação dos componentes do lúpulo (a precipitação do material proteico de elevado peso molecular e a sua amargurização, por isomerização dos ácidos alfa do lúpulo e aromatização, por solubilização de alguns óleos essenciais das formas de lúpulo empregues);
- 5) coagulação do material proteico.

Além disso, durante a ebulição do mosto são eliminados compostos voláteis indesejados, o mosto toma uma coloração específica conforme o malte empregue e o valor de pH decresce ligeiramente (Wunderlich & Back, 2009).

Nesta fase ocorre, ainda, a adição do lúpulo ao mosto, contribuindo com componentes importantes para a cerveja tais como, resinas, óleos e polifenóis. Durante a ebulição, os α -ácidos do lúpulo completamente insolúveis no mosto são convertidos a iso- α -ácidos por isomerização, conferindo sabor amargo à cerveja (Teixeira & Fonseca, 2007).

Tratamento do mosto

O tratamento do mosto inicia-se com a separação do mosto límpido do coágulo (*trub*) de fragmentos do lúpulo que não solubilizaram. Geralmente, esta separação ocorre num *whirlpool*, onde o mosto entra tangencialmente à parede lateral e as partículas suspensas são separadas por fricção, depositando-se no fundo do tanque (Teixeira & Fonseca, 2007).

Após este processo, o mosto está a elevada temperatura pelo que, deve ser arrefecido até de 6 °C a 8 °C, para fermentação baixa, ou de 12 °C a 18 °C, para fermentação alta, para que seja possível inocular a levedura (Kunze, 2004).

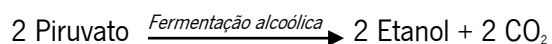
Depois de arrefecido, o mosto deve ser arejado para a propagação da levedura, até atingir cerca de 7 mg/L a 8 mg/L de oxigénio dissolvido. Industrialmente, a oxigenação é realizada recorrendo a um arejamento com ar estéril (Esslinger & Narziss, 2003).

2.3.3 Fermentação

A principal via bioquímica de uma célula de levedura para a produção de energia a partir de açúcares, na ausência de oxigénio, é a fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica transforma o mosto em cerveja, através da conversão dos açúcares obtendo-se, essencialmente, etanol e dióxido de carbono (Kunze, 2004).

O processo de fermentação é iniciado pela inoculação da levedura, adicionando-se, por volume de mosto, 0,5 L a 0,7 L de uma suspensão de levedura pesada por hectolitro de mosto, correspondendo a uma concentração celular de $15 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ a $20 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de levedura arrefecida e arejada (Esslinger, 2009).

A sequência de reações enzimáticas, pela ação da levedura, que geram piruvato a partir de glucose é referida como glicólise (Equação 1). O piruvato produzido é então convertido a etanol e CO₂, formando-se também outros componentes importantes (Equação 2) (Munroe, 2006).

**Equação 1****Equação 2**

Geralmente os açúcares fermentescíveis são assimilados pela levedura de cerveja pela seguinte ordem: frutose, glucose, maltose e maltotriose (Kunze, 2004).

Durante a fermentação, a levedura também vai assimilar aminoácidos, permitindo a síntese de proteínas no interior da célula. As proteínas são necessárias para a produção de novas células e além disso, influenciam positivamente o sabor e a estabilidade da cerveja. Existem duas classificações principais das fermentações, *ale* e *lager*. A distinção entre cervejas *ale* e *lager* é feita quer pela levedura utilizada, quer por determinadas características do processo de produção (Esslinger & Narziss, 2003).

Nas cervejas de fermentação baixa conhecidas como *lager*, o mosto é mantido a uma temperatura entre 7 °C a 13 °C, durante 5 d a 10 d. No início da fermentação há formação abundante de espuma, sendo que no final a levedura utilizada (*Saccharomyces pastorianus*) flocula, e por fim, é colhida no fundo do fermentador (Papazian, 2006).

No caso das cervejas de alta fermentação, *ale*, a fermentação é realizada a temperaturas mais altas 15 °C a 24 °C, durante 2 d a 7 d. Ao contrário das *lager*, as leveduras utilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*) não se depositam no fundo do fermentador, mas tendem a formar pequenos aglomerados de células que são levadas para a superfície do líquido, onde são coletadas (Papazian, 2006).

Sub-produtos da fermentação

As vias metabólicas que operam durante o crescimento da levedura originam sub-produtos com impacto nas propriedades sensoriais da cerveja (Briggs *et al.* 2004).

Os principais metabolitos secundários podem ser caracterizados em 5 grupos: álcoois, ésteres, ácidos orgânicos e ácidos gordos, compostos carbonílos (aldeídos e cetonas) e compostos de enxofre. A relação entre estas classes de metabolitos e o metabolismo dos açúcares e aminoácidos é demonstrada na Figura 2.

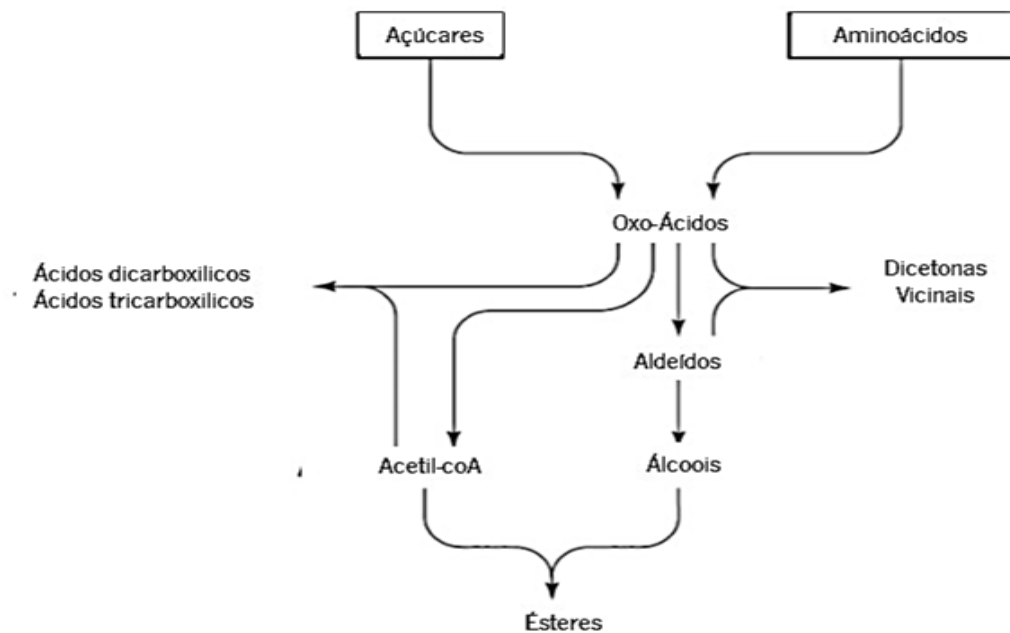


Figura 2 – Relações entre as maiores classes de compostos aromáticos derivados do metabolismo da levedura (adaptado de Briggs *et al.* 2004).

Álcoois

Além do etanol, outros álcoois são produzidos durante a fermentação, tais como os álcoois superiores. Os álcoois superiores [álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), álcool amílico (2-metil-1-butanol), *n*-propanol, 2-metil-1-propanol) e os álcoois aromáticos (2-feniletanol e tirosol) podem ser obtidos essencialmente por duas vias, anabólica ou catabólica (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Estes álcoois são considerados a maior fração dos compostos voláteis da cerveja, contribuem para o aroma da cerveja, intensificando o aroma do etanol (Russell, 2006).

Ésteres

Durante a fermentação, os ésteres são formados intracelularmente através da reação entre um álcool e derivados da coenzima A, acil/acetil-coA (Russell, 2006).

Os ésteres, característicos pelo aroma frutado, são o grupo de compostos aromáticos mais importantes produzido pela levedura durante a fermentação (Briggs *et al.* 2004).

Na cerveja pode ser detetado um grande número de ésteres, no entanto os mais importantes são o acetato de etilo, o acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de 2-feniletílico (Briggs *et al.* 2004).

Compostos carbonilo

As concentrações de compostos carbonilos, aldeídos e dicetonas vicinais, são influenciadas pelo metabolismo da levedura durante a fermentação. No geral, estes compostos contribuem de forma negativa para o aroma e sabor da cerveja. Portanto, é fundamental que durante a fermentação exista um controlo de modo a assegurar que estes compostos são reduzidos para concentrações aceitáveis (Briggs *et al.* 2004).

O acetaldeído é um composto carbonilo que, geralmente, é encontrado em altas concentrações na cerveja. O acetaldeído é formado durante a etapa final da fermentação pela ação de leveduras, variando a sua concentração durante a fermentação e maturação (Russell, 2006).

As principais causas de concentrações elevadas de acetaldeído na cerveja consistem na fraca qualidade da levedura (inóculo), excesso de inóculo ou arejamento excessivo do mosto (Teixeira & Fonseca, 2007).

As dicetonas vicinais, diacetilo e 2,3-pentanodiona, são formadas por descarboxilação oxidativa espontânea dos dois ácidos correspondentes, α -acetolactico e α -acetohidroxitirico, respetivamente (Teixeira & Fonseca, 2007).

Compostos de enxofre

Os compostos de enxofre representam uma área de grande importância na produção da cerveja na medida em que, vestígios de compostos voláteis de enxofre, contribuem significativamente para o sabor da cerveja. Em pequenas quantidades são vistos como aceitáveis ou até mesmo desejáveis para a cerveja porém, em excesso, dão lugar a *off-flavors* desagradáveis (Briggs *et al.* 2004).

Parte dos compostos de enxofre tais como, sulfureto de hidrogénio, sulfureto de dimetilo (DMS), dióxido de enxofre e tióis, são provenientes do malte, lúpulo e adjuntos mas também podem ser resultantes da atividade metabólica da levedura derivando de compostos orgânicos contendo enxofre, nomeadamente alguns aminoácidos e vitaminas (Russell, 2006). A presença de DMS em baixas concentrações, derivada em grande parte pela fase de fabrico do mosto, é vista como importante para o aroma da cerveja, sendo descrito como sabor a milho doce cozido ou vegetais cozidos (Briggs *et al.* 2004).

Ácidos orgânicos e ácidos gordos

Os ácidos orgânicos e ácidos gordos identificados na cerveja são, essencialmente, subprodutos excretados pela levedura, embora alguns possam ser derivados a partir do mosto (Briggs *et al.* 2004).

A formação de ácidos orgânicos contribui para a redução do pH durante a fermentação e confere um sabor amargo ou salgado à cerveja. Os principais ácidos orgânicos encontrados na cerveja são: o ácido acético, cítrico, láctico, málico, α -cetoglutárico, pirúvico e succínico (Briggs *et al.* 2004).

A presença dos ácidos gordos, butírico, isovalérico, hexanóico, octanóico e decanóico, é indesejável, na medida em que contribuem com sabores desagradáveis e inibem a formação de espuma na cerveja (Jackson, 2008).

2.3.4 Maturação

No final da fermentação primária, na qual são produzidos a maioria dos compostos aromáticos, a cerveja obtida é chamada de "cerveja verde". No entanto, esta cerveja ainda não é adequada para venda, na medida em que contém sabores e aromas indesejáveis, que necessitam de ser amadurecidos. De modo a aprimorar o sabor da cerveja verde, esta deve ser maturada (Briggs *et al.* 2004)

A maturação consiste numa segunda fermentação em que a cerveja é deixada em contacto com uma pequena quantidade de levedura a temperaturas baixas controladas, durante 7 d a 30 d (Esslinger, 2009).

O diacetilo, por exemplo, é um dos compostos que requer especial atenção dado o seu sabor/aroma amanteigado indesejável, sendo empírico que a sua concentração esteja abaixo do limiar de percepção, 0,10 mg/L (Kunze, 2004). Ao fim da fermentação primária, este composto está presente em concentrações muito superiores ao seu limiar de percepção. Assim, o processo de maturação é de alta importância dado que durante este processo o diacetilo tende a dissipar, devido a quebra das dicetonas vicinais (Briggs *et al.* 2004; Teixeira & Fonseca, 2007).

2.3.5 Operações de acabamento

Filtração

A filtração tem em vista a remoção dos complexos proteicos e de células de levedura ainda em suspensão, sendo responsável por tornar a cerveja mais brilhante e ao mesmo tempo, melhorando a sua estabilidade microbiológica, coloidal e organolética (Munroe, 2006).

Acondicionamento

O acondicionamento, ou embalagem, trata-se da etapa final do processo de produção da cerveja. Dependendo dos critérios de cada cervejaria, a cerveja pode ser cheia em garrafa, lata ou barril,

controlando o oxigênio (O_2 total < 0,20 mg/L) incorporado de forma a evitar possível oxidação da cerveja (Teixeira & Fonseca, 2007).

De modo a evitar problemas de instabilidade biológica, a cerveja pode ser pasteurizada a 70 °C durante 1 min (Schaechter, 2009).

2.4 Estabilidade de sabor da cerveja

A estabilidade do sabor da cerveja é das características mais importantes na qualidade do produto final, significando a capacidade da cerveja para manter as suas características inalteradas desde o momento do enchimento até ao instante em que é consumida (Gresser, 2009a).

As alterações evidenciadas no perfil de sabor da cerveja durante uma armazenagem prolongada são mostradas na Figura 3.

O processo de estabilização ou *staling process* é caracterizado por reações de oxidação dos componentes naturais da cerveja (álcoois superiores, melanoidinas, aminoácidos, ácidos gordos, resinas de lúpulo) e pela formação de outros compostos, tais como compostos carbonilos e aldeídos (Gresser, 2009b).

As alterações no sabor da cerveja podem ser divididas, essencialmente, em dois grupos: alterações na frescura e na amargura (menos harmonia no sabor em comparação com o inicial) e mudanças no aroma e aparência (Gresser, 2009b).

Estas alterações não ocorrem simultaneamente, algumas podem aparecer relativamente cedo, aquando o transporte da cerveja ou armazenamento inadequado, e outras podem aparecer semanas ou mesmo meses depois do armazenamento (Gresser, 2009b). A estabilidade depende, portanto, de diversos fatores, sendo influenciada por todas as etapas do processo de produção da cerveja. Por exemplo, o aquecimento do mosto deve ser controlado de modo a limitar a formação de produtos por reação *Maillard* (produzidos do resultado do aquecimento com açúcares e aminoácidos) e substâncias relacionadas (LaVilla, 2010).

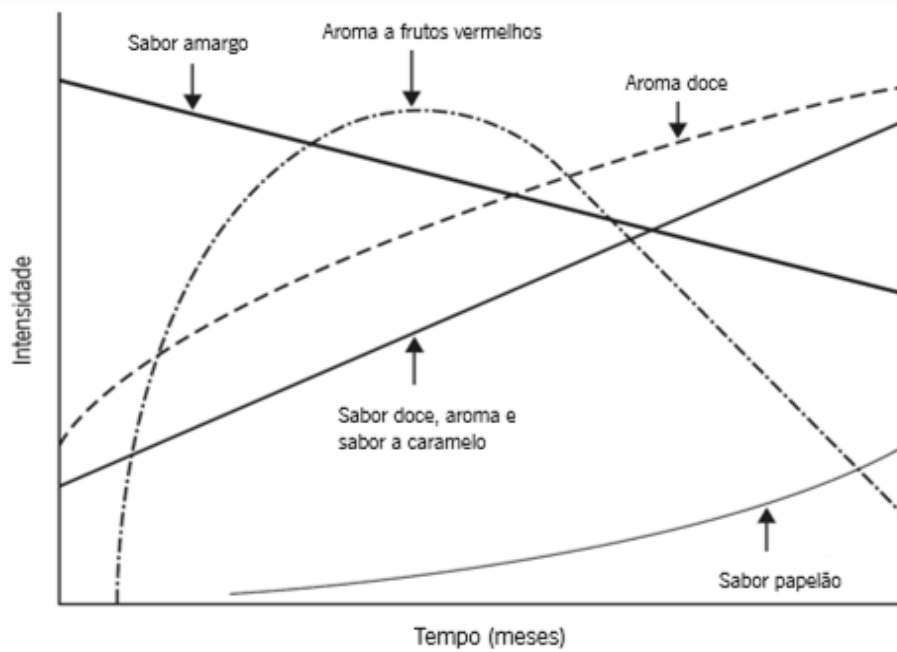


Figura 3 – Perfil do sabor da cerveja durante a estabilização (adaptado de Hernández-Artiga & Dolores, 2009).

2.4.1 Mecanismos de reação durante o processo de envelhecimento da cerveja

Durante o processo de envelhecimento da cerveja, mesmo que não sejam perceptíveis alterações gustativas, a composição química da cerveja muda. É impossível referir um único mecanismo ou uma série limitada de mecanismos que demonstrem os processos que induzem a degradação do aroma da cerveja (Gresser, 2009b). O processo de degradação mais simples é mostrado na Figura 4.

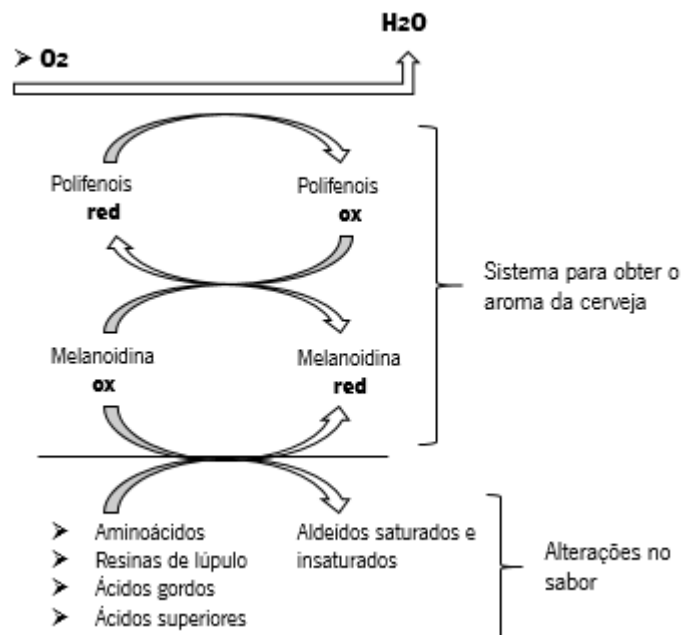


Figura 4 – Reações redox que promovem a estabilização de sabor (adaptado de Gresser, 2009b).

Alterações de compostos aromáticos

Tal como referido, numerosas reações são consideradas importantes durante o processo de estabilização de cerveja. Dos inúmeros mecanismos que têm vindo a ser sugeridos para a formação de compostos aromáticos, pode destacar-se os seguintes (Gresser, 2009b; Vanderhaegen *et al.* 2006):

- Degradação *Strecker's* de aminoácidos (temperatura/tempo);
- Oxidação de álcoois superiores (oxigénio, produtos de *Maillard*);
- Oxidação de ácidos gordos insaturados;
- Oxidação enzimática de lípidos (oxigénio);
- Acetilação de aldeídos;
- Degradação oxidativa de grupos carbonilo (oxigénio, tempo);
- Degradação de polifenóis;
- Reações *Maillard*;
- Síntese e hidrólise de ésteres voláteis.

2.5 Cerveja em barrica de carvalho

Segundo a *Brewers Association* (2014), qualquer cerveja *lager*, *ale* ou híbrida, tanto de estilo tradicional como cerveja experimental única, pode ser envelhecida por um determinado período de tempo em barrica de carvalho ou em contacto com madeira.

Estas cervejas são envelhecidas com a intenção de transmitir o carácter particularmente original da madeira e/ou da bebida que anteriormente foi envelhecida no interior da barrica. O uso de madeira nova transmite uma mistura complexa de baunilha e outras notas únicas de madeira. No entanto, o termo "envelhecido em madeira" não é apenas sinónimo de sabores de madeira. São muitas vezes reutilizadas barricas anteriormente utilizadas para maturar Rum, Whisky, Vinho do Porto, vinho e outros com o intuito de atribuir complexidade e exclusividade à cerveja (*Brewers Association*, 2014).

O processo de maturação e envelhecimento é caracterizado por alterações químicas e sensoriais da bebida, tendo como objetivo a procura do equilíbrio de sabor, aroma e paladar entre a barrica e a nova cerveja (*Brewers Association*, 2014).

2.6 Componentes da madeira: O efeito sobre o sabor da cerveja

O efeito provocado pelo envelhecimento em barrica de carvalho conduz ao desenvolvimento de sabores característicos nas bebidas alcoólicas. As principais alterações devem-se a mudanças nas composições e concentrações dos compostos que influenciam o sabor e o aroma (Mosedale & Puech, 1998). Estas alterações podem ser originadas por (Nishimura & Matsuyama, 1989):

- Extração direta de compostos da madeira;
- Decomposição de macromoléculas da madeira e extração dos compostos resultantes;
- Transformação de compostos extraídos e interações com outros compostos da bebida;
- Evaporação de compostos voláteis.

Embora a composição química da madeira difira entre espécies de *Quercus*, origens geográficas, condições climáticas, e partes da árvore, no geral é constituída por três principais componentes estruturais: lenhina, celulose e hemicelulose. Estes complexos são principalmente polímeros insolúveis em soluções hidroalcoólicas. A restante massa da madeira são constituídos por componentes de baixo peso molecular, os chamados compostos extraíveis (Pérez-Juan & Castro, 2015). A Figura 5 mostra os principais constituintes químicos do cerne da madeira.

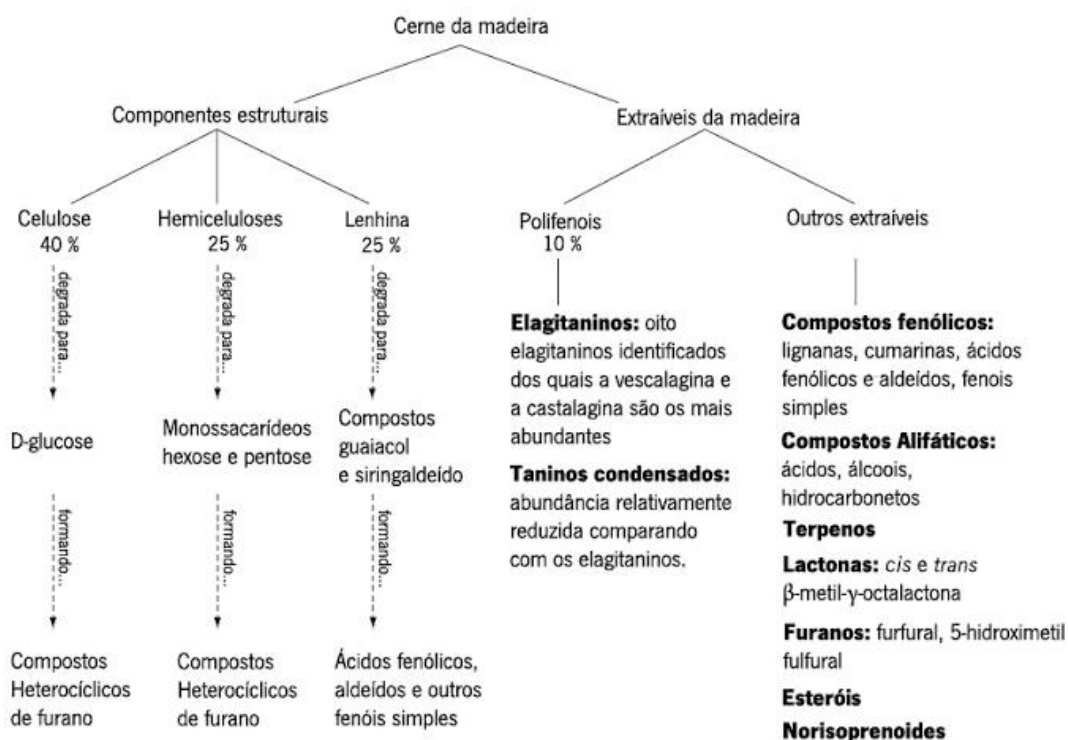


Figura 5 – Componentes do cerne da madeira e respetiva percentagem de massa (adaptado de Mosedale & Puech, 2003).

A celulose é o componente mais abundante da madeira, sendo responsável por cerca de metade do teor total. É descrito como um polímero linear de glucose, de alto peso molecular, formado pela união de β -D-glucose ligadas entre si por uma ligação glicosídica entre os carbonos 1 e 4 (Pérez-Juan & Castro, 2015).

A hemicelulose é constituída principalmente por componentes de açúcar, que podem ser divididos em 2 grupos, pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose) (Pérez-Juan & Castro, 2015).

Apesar da celulose e hemicelulose serem solúveis de modo distinto em bebidas alcoólicas, ambas sofrem degradação térmica durante a torrefação da madeira devido a reações *Maillard*. Esta degradação produz compostos de aroma nos quais as descrições olfativas incluem “amêndoa tostada”, “torrado”, “doce”, “torrada”, “cacau” e “café”, e têm a estrutura química de um furano, ou dimetilpirazina (Mosedale & Puech, 1998).

O terceiro componente principal da madeira é a lenhina, polímero fenólico tridimensional que influencia fortemente as propriedades mecânicas da madeira. A degradação da lenhina a partir da torrefação do barril de carvalho é a principal via para a produção de compostos aromáticos (Rutherford *et al.* 2011).

Para além dos principais componentes da parede celular da madeira, o carvalho também pode conter até 12 % de componentes de baixo peso molecular. Os compostos extraíveis têm um papel importante no envelhecimento de bebidas, pois são extraídos diretamente pelo contato da madeira com a bebida alcoólica e podem ter uma influência significativa no desenvolvimento do sabor durante a maturação. Estes podem ser classificados em terpenos, compostos fenólicos aromáticos, ácidos alifáticos, álcoois, substâncias inorgânicas e outros compostos (Pérez-Juan & Castro, 2015).

Os principais componentes de interesse em tanoaria são os taninos hidrolisáveis e os compostos voláteis. Os taninos hidrolisáveis são em parte responsáveis pelo amargor e adstringência, e podem desempenhar um papel como catalisadores para a oxidação durante a maturação (Mosedale & Puech, 1998).

2.6.1 Compostos derivados da madeira

A Tabela 1 lista os compostos mais relevantes que podem ser transferidos a partir da madeira para a bebida alcoólica.

Tabela 1 – Principais compostos transferidos da madeira para a bebida alcoólica e efeitos sensoriais sobre a bebida (adaptado de Pérez-Juan & Castro 2015)

Origem	Componente de Madeira	Composto	Descrição do Odor		
Tipo	Nome	Nome			
Estrutural	Celulose e Hemicelulose	Furfural	Amêndoas		
		5-metilfurfural	Amêndoas torradas		
		5-hidroximetilfurfural			
		Álcool furfúrico			
		Maltol	Caramelo, torrado		
		3-Metil-3-ciclopent-2-eno			
		3-Metil-3-ciclohex-2-eno			
		3-Metil-2-furanona			
		2,3-Dimetilpirazina	Cacau, avelã, torrada, café		
		2,5- Dimetilpirazina			
	Hemicelulose	Ácido acético	Vinagre		
	Lenhina	Fenol	Tinta		
		Guaiacol	Fumo		
		Siringol			
		4-metilsiringol			
		4-metilguaiacol	Madeira tostada		
		4-etilguaiacol	Farmácia		
		4-Vinilguaiacol	Fenólico		
		4-Vinilfenol	Farmácia		
		4-Etilfenol	Indetectável		
		Vanilina	Baunilha		
		Siringaldeído	Indetectável		
		Acetofenona			
		Acetovanilona			
		Propiovanilona			
		Butirovanilona			
		Eugenol	Cravo-da-índia		
		Sinapaldeído			
		Coniferaldeído			
		Extraível	Madeira fresca	Cis- β -Metil-y-octalactona	Coco, arborizado fresco
				Trans- β -Metil-y-octalactona	
	Vanilina			Baunilha	
	Eugenol			Alho	
Esculina					
Scopolamine					
Esculetina					
Ellagitaninos					
Gallotaninos					
Ácido gálico					
Ácido elágico					

Os constituintes tânicos da madeira, elagitaninos, hidrolisam durante a maturação do vinho. Tal como os componentes fenólicos dos vinhos, estes fenóis extraídos podem servir como substratos de oxidação

e promover a oxidação de outros componentes de bebidas, bem como contribuir para a amargura e adstringência (Pérez-Juan & Castro, 2015).

Os açúcares simples aumentam em bebidas alcoólicas envelhecidas em barris de carvalho por extração ou por hidrólise ácida da hemicelulose. Embora os níveis destes açúcares não sejam suficientemente altos para contribuírem para a percepção de doçura, contribuem para a formação de compostos de furfural e afins (Pérez-Juan & Castro, 2015).

As whiskey lactonas desempenham um papel relevante no aroma de bebidas envelhecidas, em particular o isómero *cis*, que tem um limiar de percepção muito menor do que o isómero *trans*. Estes compostos são os maiores contribuintes para o aroma “madeira” e “coco” (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Como referido anteriormente, o passo da torrefação do barril promove a degradação da estrutura da lenhina e conduz à formação de diversos produtos, tais como fenóis simples, fenóis etílicos e vinílicos, aldeídos benzoicos, entre outros (Pérez-Juan & Castro, 2015). A Tabela 1 mostra alguns dos compostos odoríficos formados e as descrições associadas (baunilha, madeira queimada, fumo, tinta e farmácia, entre outros).

Vários produtos voláteis que contribuem para o aroma do vinho, particularmente em carvalho americano, incluindo terpenos tais como linalol, β -terpineol, β -ionona e β -damascenona.

A transferência dos compostos voláteis pela madeira de carvalho para a bebida alcoólica é influenciada por diversos fatores, incluindo espécies de carvalho, fonte da madeira de carvalho, período de tempo e clima em que a madeira de carvalho é temperada e torrada, técnicas de tanoaria e idade e tamanho da barrica, bem como o tempo e temperatura de armazenamento no barril de carvalho (Cole & Noble, 2003).

As interações entre a bebida e a madeira não são igualmente intensas ao longo da vida útil do barril. De facto, a intensidade destas interações tem um declínio para níveis muito baixos após 5 anos de uso. Em determinados processos de envelhecimento, como no caso do Vinho do Porto, os componentes da madeira difundem-se menos intensamente uma vez que os barris podem estar em uso há mais de 50 anos (Pérez-Juan & Castro, 2015).

2.7 Vinho do Porto

O Vinho do Porto, *Vin de Porto* ou *Port* é um vinho natural e fortificado, produzido exclusivamente a partir de uvas provenientes da Região Demarcada do Douro, localizada no Nordeste de Portugal, na bacia hidrográfica do Douro, Figura 6. A Região Demarcada do Douro está rodeada de montanhas que lhe dão características mesológicas e climáticas particulares, estando dividida em três sub-regiões naturalmente distintas: Baixo Corgo (a oeste do rio Corgo, que desagua junto à cidade do Peso da Régua, na margem direita do rio Douro), Cima Corgo (a leste do rio Douro) e o Douro Superior (a maior sub-região, contornando o Cima Corgo por três lados, e estendendo-se até à fronteira com Espanha) (Bakker & Clarke, 2012).



Figura 6 – Sub-regiões da Região Demarcada do Douro (reproduzida de IVDP, 2015a).

Este vinho, produzido durante séculos, tem características muito próprias que são oriundas não só de fatores naturais mas também de fatores humanos e respetivas atividades aí desenvolvidas que se refletem na produção de um vinho único em todo o mundo (Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

As práticas de vinificação, baseadas em métodos tradicionais, incluem a paragem da fermentação do mosto por adição de aguardentes, (processo chamado de benefício ou aguardentação), a lotação de vinhos e o envelhecimento em tanoaria de madeira ou em garrafa (IVDP, 2015b).

Concomitantemente ao processo de produção característico, o solo xistoso, o relevo irregular (socialcos), as altas variações de temperatura entre as estações, a baixa precipitação e a luz solar intensa são características representativas do Douro. Estas condições particulares dão origem a uvas pigmentadas

altamente aromáticas com alta concentração de compostos fenólicos e de açúcares. Estes parâmetros são primordiais para a qualidade do vinho, influenciando a classificação e a seleção das vinhas (Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

Estas condições asseguram uma enorme diversidade de estilos, surpreendentes pela riqueza e intensidade de aromas e de sabor, tendo um teor alcoólico elevado, compreendido entre os 19 % vol. e os 22 % vol., uma vasta gama de doçuras (muito doce, doce, meio-seco ou extra seco) e grande diversidade de tonalidades de cor, tinto, tinto-alourado, alourado e alourado-claro (Bakker & Clarke, 2012).

Os estilos portuários comerciais são atualmente definidos por lei Regulamento n° 36/2005. Todos os vinhos são sujeitos a controlo, incluindo uma inspeção rigorosa, análise e avaliação organolética (Piggott & Lea, 2003).

De acordo com o Regulamento n° 36/2005, existem categorias especiais de Vinho do Porto designadas de *Vintage*, *Late Bottled Vintage* (LBV), Vinho do Porto com data de colheita, Vinho do Porto com indicação de idade, *Crusted*, Reserva ou *Reserve*. Tais categorias são atribuídas desde que obedçam cumulativamente às características físico-químicas e organoléticas legalmente fixadas (IVDP, 2005).

2.8 Processo de produção do Vinho do Porto

A vindima é feita quando as uvas estão muito maduras. Como forma de assegurar que a vinificação é efetuada na altura devida, os produtores de vinhos realizam várias avaliações acerca do grau de maturação das uvas. Geralmente, estas avaliações são feitas por determinações convencionais simples de sólidos dissolvidos, pH e acidez titulável (Reader, 2003).

As uvas colhidas são sujeitas ao desengace e esmagadas cuidadosamente para facilitar a maceração. As uvas estragadas (podres) são vistas como prejudiciais para a qualidade do vinho e a maioria são descartadas (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Nos processos tradicionais de vinificação usados para a produção de alguns estilos de vinho do Porto, o esmagamento das uvas era feito exclusivamente por pisar os vinhos manualmente em lagares (tanques de granito abertos, com aproximadamente 60 cm de profundidade) (Jackson, 2008; Piggott & Lea, 2003).

Atualmente, a maioria dos vinhos são vinificados em adegas modernas, por cooperativas regionais, utilizando equipamentos mecanizados que substituem o trabalho manual, como no caso da “pisa” que

foi substituída por modelos mecânicos. Estas modificações técnicas, perfeitamente controladas, têm vindo a melhorar e regularizar a qualidade do vinho do Porto, aumentando a sua rentabilidade (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

À luz destes procedimentos mais atuais, após o desengace total, as uvas são submetidas a uma maceração intensiva. Depois de esmagadas são bombeadas para cubas, onde fermentam 2 a 3 dias (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006). A fermentação é normalmente espontânea, a temperaturas compreendidas entre 25 °C e 30 °C, e sob o controlo de leveduras que ocorrem naturalmente, oriundas das uvas e/ou do equipamento adega (Bakker & Ronald, 2012; Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

A decisão de terminar a fermentação deve ser criteriosamente pensada e deve ser adotada quando a quantidade de açúcares não fermentados dá ao vinho a doçura desejada (Moreira & Guedes de Pinho, 2011). Nesse momento, o mosto em fermentação é separado da matéria sólida (escorrimento), passa para cubas onde é interrompida a fermentação por adição de aguardente vínica, em proporções determinadas (Bakker & Ronald, 2012).

2.8.1 Aguardentação ou Benefício

A aguardentação é responsável por conferir ao vinho características organoléticas específicas, possibilitando o controlo do nível de doçura desejado do produto final e melhorando a estabilidade químico-enológica (Jackson, 2009). Este passo para o metabolismo da levedura devido à toxicidade do elevado teor de etanol da aguardente, 77 % a 78 % (IVDP, 2009).

Posto isto, deve ser especialmente considerada a qualidade da aguardente utilizada na fortificação do vinho. A sua composição química e o seu potencial aromático vão afetar diretamente a qualidade do Vinho do Porto (Reader, 2003).

O IVDP tem por missão promover o controlo da qualidade e quantidade dos Vinhos do Porto, regulamentando o processo produtivo, bem como a proteção e defesa da atribuição da denominação de origem Douro e Porto e indicação geográfica Duriense. Neste caso particular, o IVDP aplica um esquema de controlo rigoroso a todos os lotes de aguardente vínica que irão ser utilizados na produção do Vinho do Porto. O controlo qualitativo é realizado através da análise físico-química e sensorial (IVDP, 2015b).

2.8.2 Maturação/Envelhecimento

Os vinhos produzidos podem permanecer no Douro, ou ser transportados, no final do ano de colheita ou no início do ano seguinte, diretamente para adegas no Entreposto de Gaia. Na chegada ao Entreposto de Gaia, ou no próprio Douro, os vinhos são submetidos a filtração e clarificação. O teor alcoólico é verificado e aumentado, se necessário, pela adição de aguardente (Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

Cada vinho é apresentado ao painel provador do IVDP para a classificação. Os melhores lotes de um único ano podem ser declarados adequados para a designação como um *Vintage*, LBV, ou Colheita. A restante maioria é usada para a mistura – *blending*. Neste momento, após a classificação, a produção de cada estilo de Vinho do Porto começa (Cristovam & Paterson, 2003).

O Vinho do Porto, enquanto jovem, é doce, frutado, intensamente vermelho, mas áspero e adstringente devido à riqueza em taninos. Este perfil é resultado dos compostos das uvas, da fermentação e da aguardentação. Os vinhos precisam de maturação para desenvolver os atributos sensoriais complexos típicos para os vários estilos do Vinho do Porto (Bakker & Ronald, 2012).

O tipo de maturação, vinhos envelhecidos em barrica de carvalho ou engarrafa, bem como o período de tempo é dependente do estilo e categoria a obter (Jackson, 2008).

A maturação em barrica de carvalho (contacto com o oxigénio) é realizada quando um envelhecimento oxidativo é desejado, enquanto a maturação em garrafa (sem contacto com o oxigénio) destina-se a um envelhecimento em ambiente redutor. Estes procedimentos distintos afetam tanto a estrutura como a qualidade do vinho, ao nível do perfil aromático e polifenólico (Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

Os processos químicos subjacentes às mudanças que ocorrem durante a maturação são complexos e nem todos são compreendidos. Algumas mudanças são características de Vinhos do Porto, mas muitas das reações que ocorrem durante a maturação dos vinhos de mesa tintos são também suscetíveis de serem relevantes durante a maturação do Vinho do Porto (Bakker & Ronald, 2012).

2.8.3 Mistura – *Blending*

A mistura ou *blending* consiste na lotação de vinhos com várias origens, de várias castas, de vários anos e com diferentes tipos de estágios (Reader, 2003).

O processo de lotação é particularmente relevante para a qualidade e estilo de Vinho do Porto. Com exceção do *Vintage*, LBV e Porto Colheita (produzidos a partir de uma única colheita), os produtores

esperam produzir lotes altamente consistentes em termos de qualidade organolética e idade média dos vinhos dentro de um estilo particular (Moreira & Guedes de Pinho, 2011).

As práticas variam em toda a indústria, mas para todos os produtores que apresentam uma grande variedade de produtos e categorias, a prática geral consiste na preparação e realização de lotes de mistura de vinhos não tratados, que servem como base das misturas de reservas finais. Estas por sua vez são preparadas a partir de outros lotes de reserva (Reader, 2003).

2.9 Compostos Voláteis no Vinho do Porto

Durante o longo período de maturação, os compostos voláteis no Vinho do Porto sofrem alterações consideráveis, evoluindo em complexidade (Hogg, 2013).

Estes componentes voláteis são derivados das uvas, da fermentação de leveduras e da aguardente utilizada no processo de fortificação. Além disso, o caráter do vinho do Porto é, indubitavelmente, determinado pelos inúmeros processos que ocorrem durante o processo de maturação, tais como alterações oxidativas, degradação de hidratos de carbono, formação e hidrólise de ésteres, formação de acetais e extração de compostos da madeira (Bakker & Ronald, 2012).

Até aos dias de hoje foram detetados mais de 200 componentes voláteis em Vinhos do Porto, dos quais 141 foram identificados. Entre estes componentes destacam-se 81 ésteres, dos quais foram encontradas elevadas concentrações de lactato de etilo, succinato de dietilo e malato de dietilo. Foram também identificados compostos carbonilos, produtos de degradação de hidratos de carbono, tais como 2-furfural e 5-metilfurfural e lactonas. Além disso, foram também reconhecidos álcoois, ácidos, componentes contendo azoto e hidrocarbonetos (Bakker & Ronald, 2012).

A atividade microbiana, particularmente o metabolismo das leveduras *Brettanomyces/Dekkera*, também exerce um impacto expressivo sobre os compostos voláteis no vinho. Este microrganismo é conhecido pela síntese de vários compostos fenólicos voláteis, nomeadamente etilfenóis. Os etilfenóis são característicos por contribuir com *off-flavors* tais como fenólico ou atributos medicinais (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Alguns destes componentes estão presentes em teores elevados o suficiente para contribuir para o aroma global do Vinho do Porto. No entanto, a importância das características organoléticas dos vários grupos de compostos voláteis identificados não explicam totalmente as propriedades sensoriais do Vinho do Porto, Tabela 2. Embora existam algumas exceções, não é fácil compreender a contribuição sensorial de

muitos destes compostos voláteis, uma vez que existe pouca informação disponível sobre a sua contribuição no aroma, e dos seus valores de limiares de deteção em 20% v/v de etanol (Bakker & Ronald, 2012).

Tabela 2 – Descritores ou atributos de vinhos do Porto com mais citações (adaptado de Vilela *et al.* 2015)

Atributo	Definição sensorial
Frutado (aroma)	Aroma associado a frutos de árvore como pêsego, maçã, damasco e ameixa.
Mel (aroma)	Aroma associado ao mel.
Madeira (aroma)	Aroma associado aos barris, à madeira.
Citrino (aroma)	Aroma associado a citrinos com limão, laranja e tangerina.
Frutos vermelhos (aroma)	Aroma associado a bagas, framboesa e morango.
Frutos secos (aroma)	Aroma associado a frutos secos como amêndoas, noz-moscada e uvas passas.
Floral (aroma)	Aroma associado a flores, nomeadamente lavanda.
Frutos vermelhos (sabor)	Sabor associado a bagas, framboesa e morango.
Frutado (sabor)	Sabor associado a frutos de árvore como pêsego, maçã, damasco e ameixa.
Moscatel (sabor)	Sabor associado ao vinho produzido pela variedade de uva portuguesa “Moscatel”.
Frutos secos (sabor)	Sabor associado a frutos secos como amêndoas, noz-moscada e uvas passas.
Gosto doce	Sensação produzida por uma solução aquosa de sacarose.
Gosto ácido	Sensação produzida por soluções aquosas de substâncias ácidas, como ácido cítrico ou ácido tartárico.
Sensação alcoólica	Sensação de queimadura na boca.
Sensação suave (paladar)	Sensação de suavidade na boca.
Sensação picante (paladar)	Sensação associada à pimenta.
Adstringência (paladar)	Paladar seco e franzido causado pelos taninos do vinho.
Corpo (paladar)	Consistência ou densidade na boca, volume na boca.
Equilíbrio	Situação onde a acidez, adstringência e, se presente, o amargo, são compensados pela doçura.
Persistência (sabor residual)	Duração do sabor global e paladar que lembra, depois de cuspir o vinho.

2.10 Métodos Analíticos

A cerveja é uma mistura altamente complexa de constituintes voláteis e não voláteis bem-definidos, fatores importantes que influenciam o seu sabor. O sabor é uma qualidade importante de qualquer cerveja, determinando os fatores que influenciam na aceitação do consumidor desta bebida, e a sua composição química, obviamente, responsável por esse sabor. A composição da cerveja tem sido sistematicamente investigada ao longo das últimas décadas, particularmente desde o advento da cromatografia em fase gasosa (CG) e da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Contudo, ainda persiste a necessidade de identificar atividades do sabor na cerveja através da análise sensorial, tanto para compreender os contribuintes para a qualidade do produto como para resolver potenciais imperfeições de sabor (Preedy, 2009).

2.10.1 Análise de constituintes não-voláteis: HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Os constituintes não-voláteis da cerveja incluem sais inorgânicos, aminoácidos, nucleótidos, polifenóis e resinas de lúpulo em conjunto com macromoléculas tais como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Tais componentes são examinados mais convenientemente por HPLC (Briggs *et al.* 2004).

O HPLC é uma técnica de separação e análise em que a amostra é arrastada por um eluente líquido, fase móvel, através de um adsorvente sólido, fase estacionária. O eluente é aspirado a partir de um reservatório com a ajuda de uma bomba e circula por todo o sistema a uma pressão elevada, a um determinado caudal e temperatura. A montante da bomba é colocado normalmente um filtro para evitar a entrada de pequenas partículas no sistema. A amostra a analisar é introduzida por uma seringa no sistema de injeção e é arrastada pelo eluente através da coluna cromatográfica que contém a fase estacionária. Muitas separações são efetuadas a temperatura superior à ambiente, sendo necessário nesse caso termostatar a coluna com o auxílio de um forno. À saída da coluna, as substâncias individualizadas passam por um sistema adequado de deteção (e.g. espectrofotómetro, refratómetro, etc.) que deve estar acoplado a um computador possuindo *software* adequado a aquisição e processamento dos dados (Lindsay, 1997).

2.10.2 Análise de constituintes voláteis: GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrography*)

Os compostos voláteis têm maior pressão de vapor e são responsáveis pelo *bouquet* ou aromas da cerveja. Eles estão concentrados no *headspace* acima do líquido num recipiente fechado e vão passar para a bebida. A mistura complexa de compostos voláteis tanto no *headspace* como do extrato solvente

da cerveja pode ser resolvida por GC-MS, onde os compostos separados são identificados e quantificados (Briggs *et al.* 2004).

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa é uma combinação de duas técnicas microanalíticas: uma de separação e outra de identificação. Este acoplamento tem várias vantagens. A diferença nas propriedades químicas entre diferentes moléculas presentes numa mistura complexa e a sua afinidade relativa para a fase estacionária da coluna vai promover a separação das moléculas da amostra enquanto esta percorre o comprimento da coluna. As moléculas são retidas pela coluna e, em seguida, saem da coluna em tempos diferentes, isto permite que o espectrómetro de massa a jusante capture, ionize e detete as moléculas ionizadas separadamente, fornecendo informação qualitativa e quantitativa desses mesmos compostos (Smiths detection, 2014).

A análise de compostos voláteis nas cervejas requer o uso de uma técnica de extração antes da análise instrumental. Uma vez que a cerveja tem componentes não voláteis, a injeção direta da amostra no cromatógrafo de gás leva à contaminação do instrumento, necessitando assim de uma manutenção frequente do equipamento de forma a obter resultados fiáveis (Charry-Parra *et al.* 2011).

2.11 Análise sensorial

A maioria, senão todas as cervejas produzidas globalmente, são avaliadas por algum tipo de experiência sensorial antes de serem lançadas no mercado. A razão é muito simples: a complexidade química da cerveja impede uma análise completa, por isso o teste sensorial permite que a cerveja seja avaliada de modo semelhante àquela que é feita pelo consumidor. A maioria dos testes sensoriais feitos à cerveja depende de algum modo do perfil de sabor, em que a cerveja é avaliada quanto ao aroma e sabor e em que é pedido ao avaliador para registar cada uma das descrições (Hughes, 2009; Lawless & Heymann, 2010).

As opções disponíveis para a avaliação sensorial da cerveja dependem das questões colocadas pelo analista. São inúmeras as circunstâncias em que serão necessários dados sensoriais tais como, por exemplo, garantir a aceitabilidade de um produto certificado antes da sua colocação no mercado ou assegurar que qualquer alteração (mínima) do processo não afeta as características do sabor de uma marca, definir os atributos sensoriais de marcas desconhecidas (como novas marcas próprias, marcas concorrentes) ou solucionar eventuais problemas detetados nos sabores (Hughes, 2009). Cada uma das circunstâncias mencionadas anteriormente requerem diferentes capacidades do provador e diferentes questionários a ser colocados pelo analista sensorial.

2.11.1 Testes sensoriais

Os atuais métodos de avaliação sensorial compreendem um conjunto de técnicas com registos padrão estabelecidos de uso na indústria e na pesquisa académica (Lawless & Heymann, 2010).

A principal preocupação de qualquer especialista em avaliação sensorial é assegurar que o método de teste é apropriado para dar resposta às questões colocadas acerca do produto em teste. Por esta razão, os testes são geralmente classificados de acordo com a sua finalidade principal e uso mais válido. São comumente utilizados cinco tipos básicos de métodos de avaliação de sabor, cada um com um objetivo diferente e usando para cada um participantes selecionados sob diferentes critérios. Estes testes são: teste triangular, teste de análise descritiva, teste de preferência, teste de escala e teste de consumo (Lawless & Heymann, 2010).

2.11.2 Provadores

Ao contrário de outros métodos de análise, que fazem uso de vários instrumentos e equipamentos, a avaliação sensorial é orientada por indivíduos e depende das suas perceções sensoriais. Os provadores são selecionados com base nas suas capacidades para distinguir certos aromas e sabores. Nem todos podem demonstrar o nível de sensibilidade necessário e aqueles que o conseguem, precisam de treino para identificar e nomear o leque de características encontradas na cerveja. Este processo pode demorar vários meses até que o provador se qualifique como membro do painel de provadores. Posteriormente, os provadores devem ser sujeitos, periodicamente, ao padrão de sabores e cheiros para testar a perspicácia (Phillishkirk, 2006).

2.11.3 Ambiente da análise sensorial

As salas de degustação devem ser projetadas especificamente para o efeito, com as seguintes condições básicas: ser sossegada, luz ténue, boa ventilação e ar condicionado, livre de odores, separação de provadores, de preferência em cabines. Os provadores não devem usar perfumes nem comer ou beber imediatamente antes da sessão (Phillishkirk, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Barricas

Foram analisadas 6 cervejas artesanais maturadas em barricas de carvalho e uma cerveja controlo, Tabela 3.

As barricas foram reutilizadas do envelhecimento de Vinho do Porto, não tendo sido higienizadas nem sujeitas a nenhuma alteração e por essa razão continham ainda no seu interior borras do Vinho do Porto, anteriormente envelhecido nas mesmas.

Estas amostras foram analisadas no final do tempo de estágio microbiologicamente, quanto à presença de *Brettanomyces*, bactérias lácticas, acéticas e leveduras e quimicamente, realizando-se uma quantificação dos compostos maioritários e minoritários. Estas análises foram realizadas em duplicado.

Tabela 3 – Nomenclatura das amostras analisadas e respetivos processos, volumes e data de início de estágio

Nomenclatura	Processo	Volume (L)	Tempo de estágio (meses)
Barrica 1	Atestada com cerveja <i>Belgian Dark</i> e maturada até ao final.	250	16
Barrica 2	Atestada com cerveja <i>Belgian Dark</i> , maturada durante 8 meses, esvaziada e atestada novamente com mosto fresco de <i>Belgian Dark</i> , sem adição de inóculo e deixada a fermentar com <i>air-lock</i> .	250	16
Barrica 3	Atestada com <i>Belgian Dark</i> , maturada até à data do final do ensaio.	300	11
Barrica 4	Atestada com <i>Belgian Dark</i> , maturada até à data do final do ensaio.	300	11
Barrica 5	Atestada com mosto fresco de <i>Belgian Dark</i> e inoculada com levedura <i>Belgian Abbey</i> , fermentadas com <i>air-lock</i> e fechadas no final da fermentação para maturação.	300	3
Barrica 6	Atestada com mosto fresco de <i>Belgian Dark</i> e inoculada com levedura <i>Belgian Abbey</i> , fermentadas com <i>air-lock</i> e fechadas no final da fermentação para maturação.	300	3
Controlo	Cerveja <i>Belgian Dark</i> produzida pelo processo de produção de cerveja artesanal.	200	3

3.1.2 Formulação – *Blends*

A partir das barricas existentes procedeu-se à formulação de misturas (*blends*). Tal como acontece em práticas comuns de Vinho do Porto, o objetivo dos *blends* é criar um lote a partir de lotes de qualidade não superior, obtendo-se um produto final de maior interesse. A composição de cada *blend* foi estabelecida numa análise sensorial prévia ao conteúdo das barricas por um painel interno de provadores especializados.

Estes *blends* foram analisados quanto aos compostos maioritários, em duplicado, e quanto aos compostos minoritários e foram sujeitos a uma prova de análise sensorial.

Na Tabela 4 são apresentados os *blends* e as respetivas composições.

Tabela 4 – Nomenclatura dos *blends* e respetivas composições

Nomenclatura	Composição (%)			
	Barrica 1	Barrica 3	Barrica 4	Barrica 5
A	-	50	50	-
B	20	40	40	-
C	20	37,5	37,5	5

3.2 Meios de cultura para identificação microbiológica

3.2.1 Meio DBDM (*Dekkera/Brettanomyces differential medium*)

O método seletivo e diferencial para *Brettanomyces/Dekkera* desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2001), foi utilizado com algumas modificações. A composição do meio (em g/L) é: Extrato de levedura, 6,2; etanol, 48; ácido *p*-cumárico, 0,1; ciclohexeximida 0,01; verde bromocresol, 0,022 (previamente dissolvido em NaOH); clorafenicol 0,1; oxitetraciclina 0,1; agar, 20 e o pH ajustado para 5,4.

O meio permite a diferenciação das estirpes de *Brettanomyces/Dekkera* pela produção de 4-etilfenol (*off-flavor*) através da inclusão de ácido *p*-cumárico.

3.2.2 Meio MRS (*deMan, Rogosa e Sharpe medium*)

O meio de cultura MRS, baseado na formulação de deMan, Rogosa e Sharpe, é recomendado para o cultivo de todas as espécies de *Lactobacillus*. O meio foi preparado a partir da composição do meio: formulação MRS a 55,2 g/L e agar a 15 g/L.

3.2.3 Meio YPM (*Yeast extract peptone mannitol medium*)

O meio de cultura YPM foi utilizado para a identificação de bactérias acéticas. Este meio tem a seguinte composição (em g/L): extrato de levedura a 5 g/L, peptona a 3 g/L, manitol a 25 g/L e agar a 12 g/L.

3.2.4 Meio YPD (*Yeast extract peptone medium*)

O meio de cultura YPD utilizado para a identificação do crescimento de leveduras foi preparado a partir de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose e 15 g/L de agar.

3.3 Quantificação dos compostos majoritários

HPLC

O etanol e os ácidos orgânicos (málico, tartárico e láctico) foram quantificados por HPLC, usando um cromatógrafo (Jasco) equipado com um detector (Jasco 830-RI) de refração índice (RI), um detector de UV-visível (Jasco 870-UV-visível) e uma coluna 87 H Chrompack (7,8 mm x 300 mm) a 60 °C. O eluente utilizado foi uma solução aquosa de ácido sulfúrico a 5 mmol/L, a um caudal de 0,7 mL/min e um volume de injeção de 20 µL.

3.4 Quantificação dos compostos minoritários

3.4.1 Extração dos compostos voláteis

Num tubo de cultura de 10 mL (Pyrex, ref. 1636/ 26MP), adicionou-se 8 mL de solução preparada, a 100 µL de padrão interno (4-nonanol, 308 mg/L) e uma barra de agitação magnética (22,2 mm x 4,8 mm).

A extração foi realizada por agitação da amostra com 400 µL de diclorometano, durante 15 min, com recurso a uma placa de agitação magnética. Após o arrefecimento a 0 °C durante 15 min, a barra de

agitação magnética foi removida e a fase orgânica foi separada por centrifugação (4000 min^{-1} , 7 min), sendo o extrato recuperado para um *vial*, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. De seguida, desidratou-se o extrato aromático por adição, em excesso, de sulfato de sódio anidro e transferiu-se o extrato para um novo *vial*.

3.4.2 GC-MS

A análise dos compostos voláteis foi realizada com recurso a um equipamento de GC-MS, composto por um cromatógrafo Varian Saturn 2000 equipado com um injetor 1079 e detetor de massas *ion-trap* (IT-MS).

Injetou-se $1 \mu\text{L}$ de amostra em modo *splitless* (durante 30 s) numa coluna Sapiens-Wax MS Teknokroma ($30 \text{ mm} \times 0,15 \text{ mm}$, espessura do filme de $0,15 \mu\text{m}$). A temperatura do injetor foi de $250 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura do forno foi mantida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 min. De seguida, programou-se a temperatura para aumentar de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até $234 \text{ }^\circ\text{C}$, a $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$; $234 \text{ }^\circ\text{C}$ até $260 \text{ }^\circ\text{C}$, a $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$; $260 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. O gás de transporte utilizado foi o hélio GHE4x (Praxair) a um caudal constante de $1,3 \text{ mL/min}$. O detetor foi ajustado para o modo de impacto eletrónico (70 eV), como uma gama de aquisição de 35 m/z a 300 m/z (*delay* = 2,18 min).

Os compostos foram quantificados (análise semiquantitativa), como equivalentes de 4-nonanol, com recurso ao software Star – Chromatography Workstation versão 6.9.3 (Varian).

3.5 Análise Sensorial

Os três *blends* formulados foram sujeitos a uma prova sensorial, realizada por um painel treinado de quatro elementos. As três cervejas foram apresentadas ao painel no final do estágio em barrica de carvalho. As características avaliadas foram a aparência, o aroma/odor e o sabor, em que cada provador atribuiu *scores* de 0 a 10, Figura 7. Um *score* de 0 significa que o atributo não estava presente na cerveja, enquanto 10 significa que o atributo era extremamente intenso na amostra.

Aparência	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Observações
Cor												
Turbidez												
Espuma												
Qualidade visual global												

Aroma/Odor	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Observações
Frutado												
Solvente												
Cartão												
Frutos Vermelhos												
Caramelo												
Sulfuroso												
Floral (<i>hop</i>)												
Fumado												
Café												
Madeira												
Baunilha												
Farmácia												
Anisado												
Frutos secos												
Mel/Melaço												
Vinho do Porto												
Qualidade aromática global												

Sabor	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Observações
Doce												
Amargo												
Lupulado												
Tostado												
Acidez												
Qualidade gustativa global												

<i>Overall rating</i>	
-----------------------	--

Scores from 0-10

Overall rating from 0-10

Figura 7 – Folha de prova apresentada ao painel no teste sensorial.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 Identificação microbiológica

Esta identificação microbiológica foi realizada com o intuito de correlacionar os microrganismos identificados com a microflora característica da barrica e da presença das borras de Vinho do Porto.

As Figuras 8, 9, 10 e 11 apresentam as placas com os meios de cultura DBDM, MRS, YPM e YPD, respetivamente, utilizadas para a identificação de *Brettanomyces* (DBDM), bactérias lácticas (MRS), bactérias acéticas (YPM) e leveduras (YPD) nas barricas e no controlo.

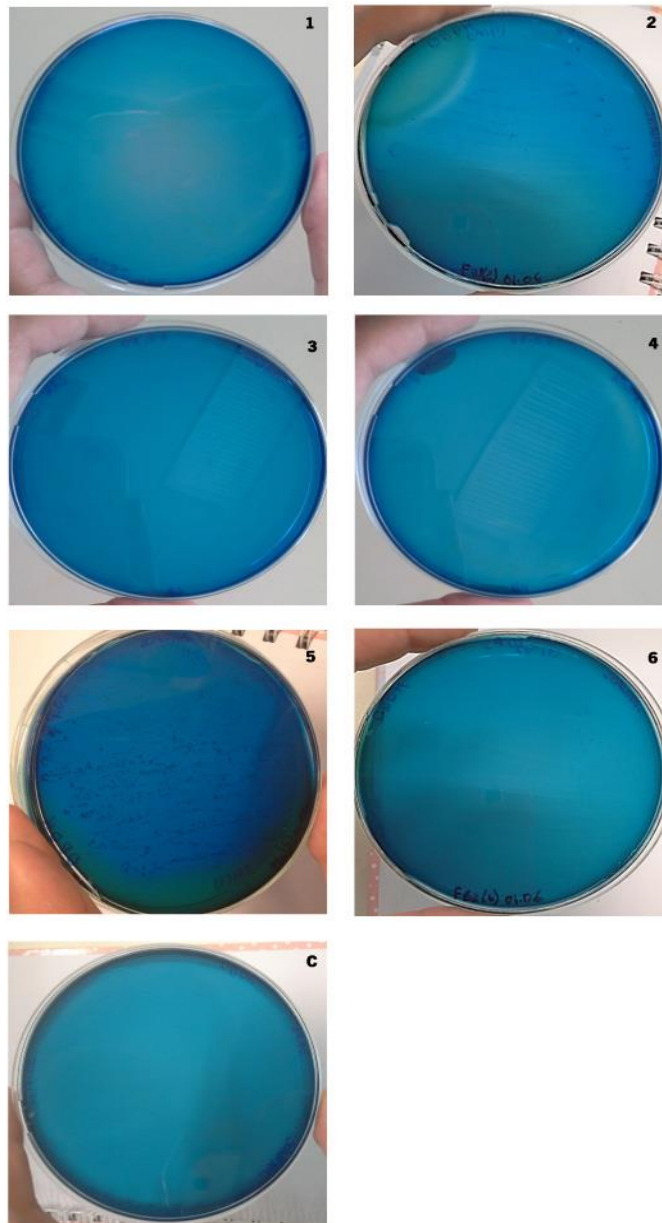


Figura 8 – Identificação do crescimento de *Brettanomyces*, em meio de cultura DBDM, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.

A partir da inoculação das amostras de cerveja no meio diferencial DBDM foi possível identificar o crescimento de *Brettanomyces* nas placas correspondentes às barricas 2, 5 e 6. A identificação do crescimento desta levedura foi feita pela observação do crescimento de colónias nas placas, Figura 8. Além disso, este meio de cultura tem a particularidade de ser característico pela mudança de cor, azul passa para verde/amarelo devido à produção de ácido, e pela deteção de odor a fenólico originário da produção de 4-etilfenol (Rodrigues *et al.* 2001). A deteção olfativa foi feita ao fim de um período, aproximado, de 15 dias. Sendo que o período mínimo necessário para o aparecimento de colónias de *Brettanomyces/Dekkera* é de 8 dias (Rodrigues *et al.* 2001).

Pela identificação olfativa, constatou-se um odor intenso a fenólico na placa referente à barrica 5, seguido da barrica 2 e menos intenso na placa da barrica 6. Tal como se verifica pela Figura 8, o número de colónias visíveis segue a mesma ordem referida anteriormente, sendo superior na placa da barrica 5 e inferior nas barricas 2 e 6.

No controlo, a presença de *Brettanomyces* foi negativa, não tendo sido observado nenhuma das características diferenciais do meio de cultura.

Esta levedura é, habitualmente, encontrada em vinhos, sendo responsável pela sua deterioração (Schaechter, 2009). Portanto, este resultado foi o primeiro indicador da ação da microflora presente nas barricas, na alteração química e biológica das cervejas analisadas.

A ausência de *Brettanomyces* nas cervejas maturadas nas barricas 1, 3 e 4 poderá significar que no momento em que a análise foi realizada, esta levedura já estaria na fase de declínio, sendo que a concentração poderá ser inexistente ou tão pequena que não foi possível detetar.

Por outro lado, nas barricas 2, 5 e 6 a presença de *Brettanomyces* poderá indicar que no momento da análise a levedura estaria na fase de crescimento, ou numa fase em que ainda era possível a sua deteção. Se a análise fosse repetida mais tarde, provavelmente a *Brettanomyces* já estaria na fase de declínio e não seria detetada a sua presença.

No que diz respeito às bactérias lácticas, foi observada a sua presença nas cervejas das barricas 2, 5 e 6, Figura 9. A ausência destas bactérias foi observada no controlo e nas cervejas das barricas 1, 3 e 4, Figura 9. Este comportamento foi o mesmo observado em relação à *Brettanomyces*, e como tal, a mesma hipótese da fase de crescimento em que a levedura se encontrava é aplicada neste caso.

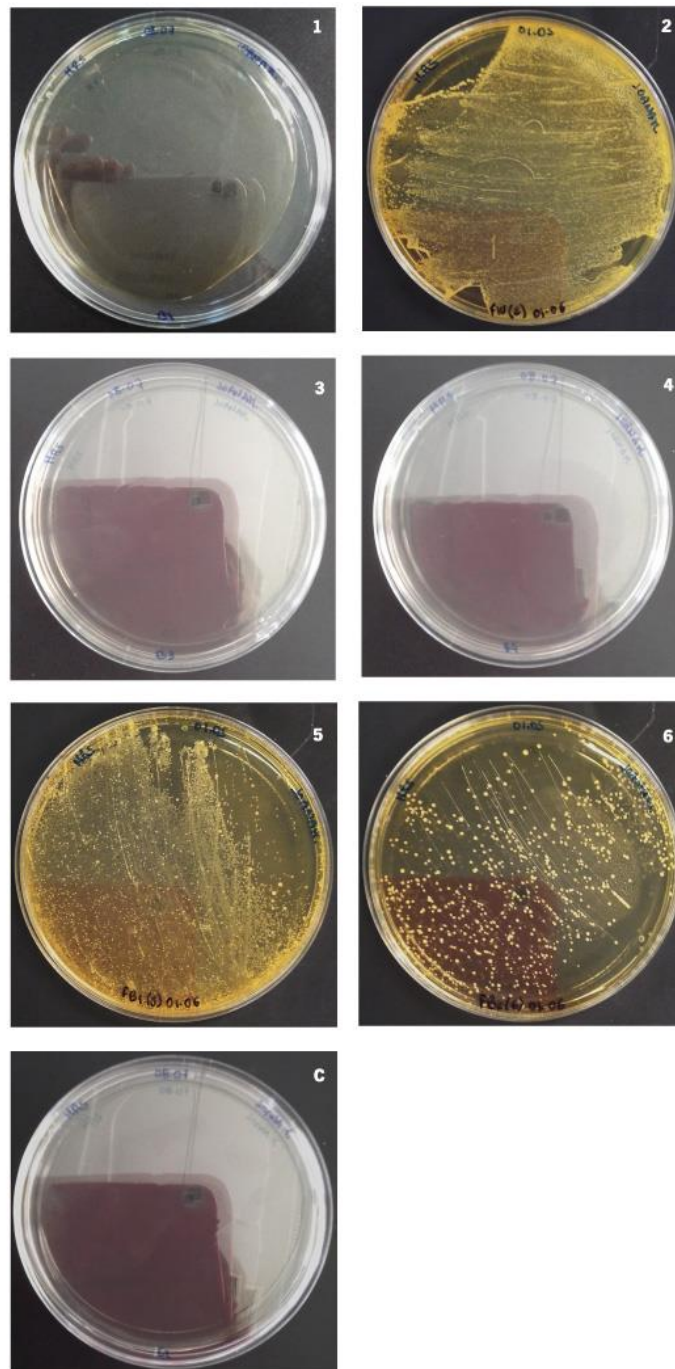


Figura 9 – Identificação do crescimento de bactérias lácticas, em meio MRS, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo. Estas bactérias são características dos vinhos, estando presentes em todos os mostos de uvas. Assim, a sua deteção sustenta, novamente, o impacto do Vinho do Porto nas cervejas maturadas em barrica (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

Quanto às bactérias acéticas, a sua presença foi detetada, através do meio de cultura YPM, em todas as cervejas analisadas, Figura 10. Da análise do crescimento de bactérias acéticas verificou-se que este foi superior nas cervejas das barrica 2 e 5, Figura 10.

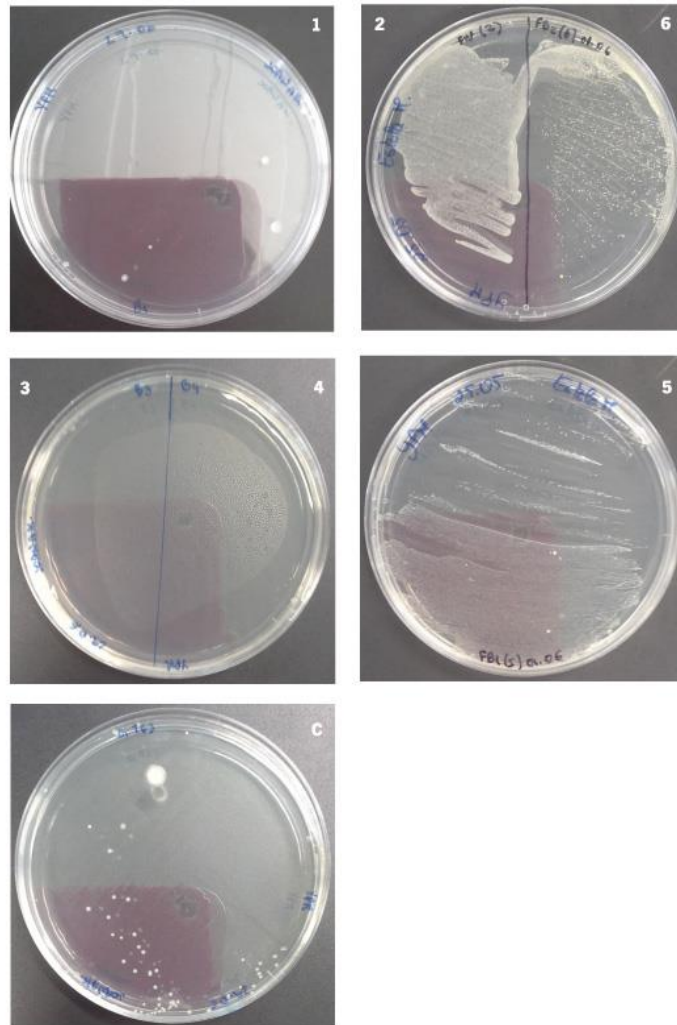


Figura 10 – Identificação de bactérias acéticas, em meio YPM, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controlo.

O crescimento elevado de leveduras no meio de cultura YPD foi observado no caso das cervejas das barricas 2, 5, 6 e no controlo, Figura 11. Enquanto nas restantes cervejas foi observado um crescimento menor.

Este resultado é concordante com o tempo de estágio das cervejas em barricas, sendo que a presença de levedura deverá diminuir ao longo do tempo, logo, é natural que nas cervejas maturadas há mais tempo, barricas 1, 3 e 4, a presença de levedura seja menor.

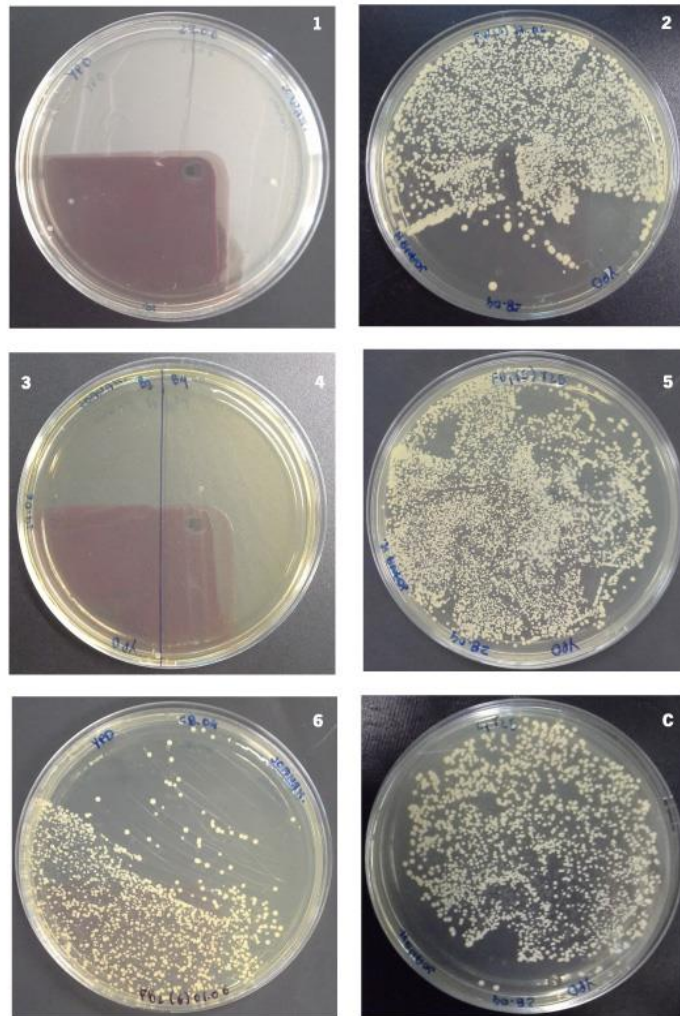


Figura 11 – Identificação de leveduras, em meio de cultura YPD, nas barricas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e no controle.

4.2 Compostos maioritários

A Figura 12 apresenta o teor de álcool (% vol./vol.) no final do ensaio para todas as cervejas maturadas em barrica de carvalho e no controlo.

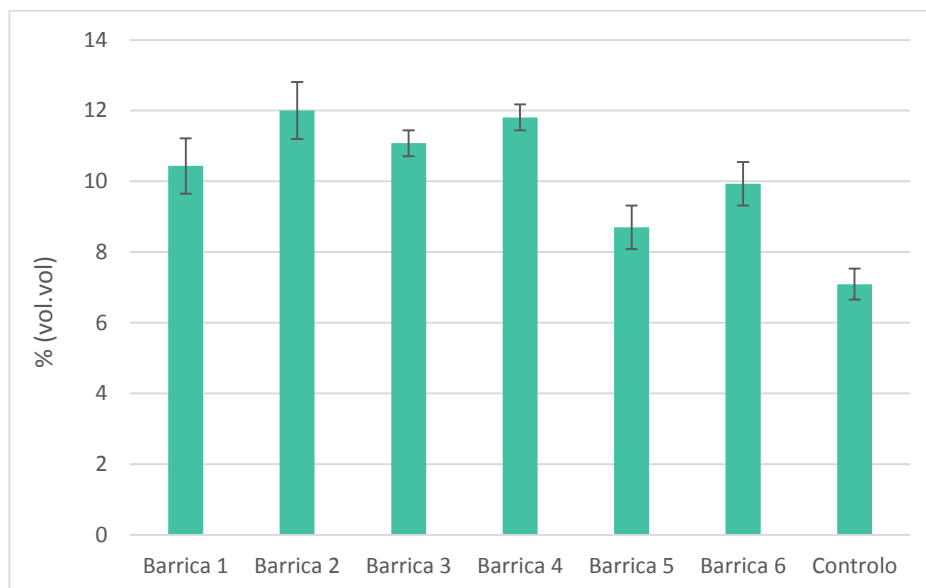


Figura 12 – Teor de álcool final (% vol./vol.) no final do ensaio para todas as barricas e controlo.

Pela análise do gráfico da Figura 12 verifica-se que as cervejas maturadas em barrica, tal como expectável, apresentam um teor alcoólico superior ao controlo. A diferença entre o aumento do teor alcoólico nas barricas em relação ao controlo, poderá estar relacionado com as borras de Vinho do Porto, anteriormente envelhecido nas barricas em estudo, cujo teor alcoólico geralmente está compreendido entre os 19 % vol. e os 22 % vol. (IVPD, 2015b).

Considerando as barricas 5 e 6 constata-se que o teor alcoólico destas é inferior às outras barricas analisadas. Em particular é de realçar esse resultado na barrica 2 uma vez que foi reatestada ao mesmo tempo das barricas 5 e 6. Tal poderá ser justificado pelo facto de as leveduras inoculadas nas barricas 5 e 6 não estarem adaptadas para a produção eficiente de etanol nas condições existentes no meio, como a elevada acidez e temperatura não controlada, levando ao stress da levedura, resultando numa menor produção de etanol.

Por outro lado, na barrica 2, em que não foi adicionado inóculo, a população endógena presente na barrica poderá estar de tal forma adaptada às condições do meio que é capaz de produzir mais eficientemente etanol. Essa população endógena e a sua adaptação ao meio poderá resultar de todo o processo pelo qual a barrica passou, desde o envelhecimento do Vinho do Porto, maturação de uma cerveja *Belgian Dark* até ser atestada novamente com mosto fresco de *Belgian Dark*.

A Figura 13 ilustra a concentração dos ácidos orgânicos, tartárico, málico, e láctico nas cervejas no final do estágio em barrica de carvalho.

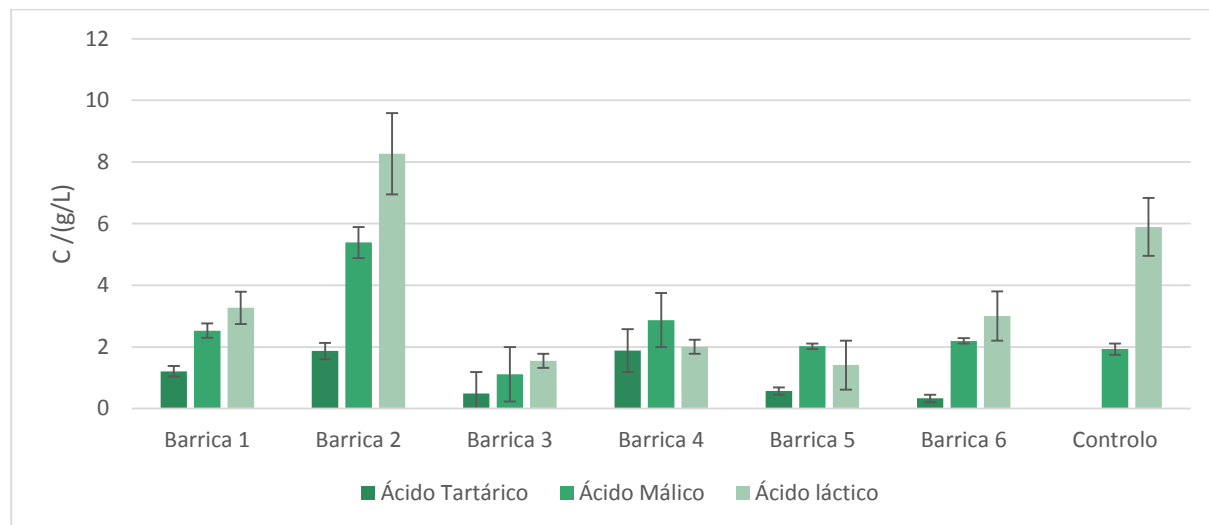


Figura 13 – Concentração de ácidos orgânicos, tartárico, málico e láctico, no fim do período de estágio em barrica de carvalho nas diferentes barricas e controlo.

Através da observação do gráfico da Figura 13, constata-se que os ácidos orgânicos, tartárico, málico e láctico estão presentes em todas as amostras analisadas, à exceção do ácido tartárico que não está presente no controlo.

Estes ácidos são os principais ácidos orgânicos que predominam nos vinhos (Moreira & Guedes de Pinho, 2011). O ácido tartárico, juntamente com o ácido málico, é responsável por cerca de 70 % a 90 % do teor de ácido nas uvas (Cristovam & Paterson, 2003). Enquanto o ácido láctico, quando ocorre como um dos principais constituintes do vinho, é resultado da ação das bactérias de ácido láctico, que vão decompor o ácido málico em ácido láctico – fermentação maloláctica (Jackson, 2014).

A partir disto, é possível estabelecer uma relação entre os ácidos quantificados nas cervejas e os ácidos predominantes do Vinho do Porto. Uma vez que, os ácidos málico e láctico também fazem parte dos principais ácidos orgânicos encontrados em cerveja, o ácido tartárico é o grande indicador da influência do vinho nas cervejas (Briggs *et al.* 2004). Deste modo, é perceptível que a quantificação deste ácido na cerveja maturada/fermentada nas barricas poderá advir das borras de Vinho do Porto ou da presença deste ácido na madeira da barrica proveniente da anterior maturação de Porto.

4.3 Compostos minoritários

A Tabela 5 apresenta as concentrações dos compostos voláteis minoritários expressas como equivalente 4-nonanol.

Não obstante a importância de todos os compostos identificados, são apenas apresentados na Tabela 5 aqueles que se consideraram mais relevantes em função do objetivo pretendido.

Quantitativamente, os álcoois formam a maior parte dos extratos, sendo que 80 % destes são formados durante a fermentação alcoólica dos açúcares (Williams *et al.* 1983).

Os álcoois superiores caracterizam-se por conter mais do que dois átomos de carbono e incluem os álcoois de cadeia ramificada de 2-metilpropanol (isobutanol), 2-metil-butanol (álcool amílico), e 3-metil-butanol (álcool isoamílico), e o álcool aromático tirosol (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

O isobutanol, o álcool amílico e o álcool isoamílico foram identificados em todas as amostras analisadas, à exceção do álcool amílico e álcool isoamílico que não foram encontrados na barrica 1. Em relação às concentrações obtidas verifica-se que os dois últimos obtiveram concentrações superiores ao isobutanol. No geral, denotou-se que as concentrações foram superiores nas cervejas maturadas em barricas de carvalho, tal reflete o impacto do estágio em barrica de carvalho em que as transformações resultantes da interação da cerveja com o meio envolvente resultou num aumento da concentração destes compostos.

O tirosol foi identificado em todas as amostras de cervejas analisadas. A concentração de tirosol variou no intervalo de 0,5 µg/L a 100 µg/L, distinguindo-se a concentração elevada obtida na cerveja da barrica 1 que corresponde à cerveja com maior tempo de maturação (16 meses). O controlo apresentou uma concentração de 9 µg/L apresentando diferenças pouco significativas comparativamente às outras barricas.

O volátil *Z*-3-hexenol, também chamado de *cis*-3-hexenol, foi identificado em concentrações semelhantes em todas as cervejas maturadas em barricas de carvalho, variando entre 8 µg/L e 16 µg/L e não sendo detetado na cerveja controlo. O *Z*-3-hexenol pode ser formado a partir da fração lipídica do sumo das uvas, através da ação de várias enzimas (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Pode, portanto, afirmar-se que as amostras adquiriram este composto a partir do conteúdo das barricas obtido da maturação de Vinho do Porto. Novamente, a cerveja da barrica 1 com maior tempo de maturação é a que apresenta a concentração mais elevada deste composto.

Tabela 5 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) dos compostos voláteis minoritários detetados nas barricas e no controlo

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	CONTROLO	DESCRITOR AROMÁTICO
Acetato de isoamilo	142,5	131,9	555,7	206,5	83,0	86,0	880,9	Banana [1]
Butirato de etilo	112,7	96,5	213,7	199,9	82,4	96,9	68,7	Papaia, adocicado, maçã [2]
Hexanoato de etilo	310,4	236,2	282,7	273,4	150,8	171,8	69,8	Frutado, maçã verde [2]
Lactato de etilo	2749,2	1089,8	684,9	917,9	984,7	976,0	2,3	Morango, framboesa, perfumado [2]
Octanoato de etilo	280,8	324,8	408,3	381,1	419,7	556,7	130,8	Maçã, frutado, doce [2]
Succinato de dietilo	1463,6	567,5	916,5	976,1	405,7	535,4	6,0	
Malato de dietilo	379,3	67,5	393,3	503,5	297,5	502,6	n.d.	
Acetato de 2-feniletilo	n.d.	n.d.	359,4	144,7	n.d.	55,8	139,8	Floral, banana e maçã [5][8]
2-metil-1-propanol	935,8	481,1	320,1	623,3	661,3	560,7	697,3	
1-hexanol	250,1	95,1	127,0	153,5	113,1	130,7	16,8	
Z3-hexenol	15,8	7,9	9,6	12,5	13,4	12,8	n.d.	Relva [2]
3-etoxi-1-propanol	18,9	8,8	6,9	13,1	11,8	7,4	1,8	
2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol	n.d.	10959,1	3698,7	14171,4	11914,3	11622,0	9368,4	Banana [8]
1-octanol	34,3	26,1	22,3	17,6	24,4	20,3	14,6	Coco, nozes, oleoso [4]
Alcool furfurílico	354,2	208,2	89,4	161,5	154,8	143,3	138,0	Palha, mofo [6]
Furfural	80,9	27,0	13,5	15,7	4,3	5,9	n.d.	Amêndoa torrada [8]
1-butanol	218,6	70,4	75,7	108,4	41,9	38,1	n.d.	Maltado, Solvente, linhaça [3]
Metionol	97,1	33,4	49,8	89,0	85,0	66,1	45,0	Batata cozida [8]
Tirosol	105,1	18,9	12,5	28,3	23,2	0,6	9,0	Amargo, químico [4]
Linalol	166,9	112,9	173,4	180,7	121,3	97,9	112,3	Anis, terpeno, limão [3]
Eugenol	n.d.	n.d.	2,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Cravo-da-índia [6]
4-etilguaiaicol	88,5	1061,2	74,0	79,5	170,6	68,5	n.d.	Farmacêutico, estábulo [10]
4-etilfenol	101,5	388,8	57,7	72,7	66,5	29,3	n.d.	Farmacêutico, estábulo [10]
4-vinilguaiaicol	n.d.	n.d.	0,8	0,1	n.d.	0,7	n.d.	Fenólico, amargo, farmacêutico [7]
2,6-dimetil pirazina	3,3	1,3	n.d.	0,2	1,3	1,4	2,2	
3-metil-2(5H)-furanona	4,3	0,9	1,1	1,8	n.d.	1,4	1,8	
Ácido 3-metil-butírico	34,4	35,9	84,5	141,3	118,3	6,2	70,8	Gorduroso, rançoso [5]
Ácido hexanóico	762,3	412,1	568,4	729,7	320,8	376,0	253,6	Queijo, óleo vegetal, suado [3]
Ácido decanóico	1071,6	40,3	275,9	175,5	186,8	239,3	911,0	Cera, sebo, rançoso, sabão [4]
Ácido octanóico	2579,8	995,5	1885,9	2279,5	1206,1	1386,9	1738,9	Ranço, óleo vegetal, suado [4]
Siringaldeído	25,4	n.d.	17,5	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	
5-hidroximetil furfural (HMF)	n.d.	0,8	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	
5-metilfurfural	n.d.	n.d.	3,1	n.d.	3,2	1,5	n.d.	Amêndoa torrada [8]

Tabela 5 – Concentrações dos compostos voláteis minoritários detetados nas barricas e no controlo (continuação)

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	CONTROLO	DESCRITOR AROMÁTICO
Whiskey lactona I	12,0	8,9	8,7	10,1	5,6	3,9	n.d.	Coco, carvalho [8]
Whiskey lactona II	10,6	12,3	71,1	28,5	14,2	13,3	n.d.	Coco, carvalho [8]
γ -caprolactona	28,7	26,8	13,8	16,1	8,6	9,4	n.d.	
γ -nonalactona	205,8	79,4	109,9	123,1	85,5	88,8	40,1	Coco, doces frutados, baunilha [9]
Maltol	181,1	115,3	58,8	126,5	100,3	107,4	121,2	Caramelo, torrado [8]
Furaneol	155,8	282,9	47,9	105,5	121,6	106,6	101,5	Caramelo [3]
1,1-dietoxipropan-2-ona	n.d.	n.d.	18,3	19,3	24,4	24,5	n.d.	

n.d. – não detetado

[1] (Guth, 1997); [2] (Siebert *et al.* 2005); [3] (Czerny *et al.* 2008); [4] (Meilgaard, 1975); [5] (Escudero *et al.* 2004); [6] (Boiron *et al.* 1988); [7] (Boutou & Chatonnet, 2007) [8] (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006); [9] (López *et al.* 1999); [10] (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Os ésteres voláteis são considerados como sendo os compostos de aroma mais importantes presentes na cerveja, sendo responsáveis por atribuir sabores frutados altamente positivos para a cerveja fresca (Vanderhaegen *et al.* 2006).

Dos 60 ésteres diferentes que a cerveja por norma contém, apenas cerca de 6 são de grande importância para as propriedades aromáticas da cerveja: acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, β -fenilacetato dietilo (Kunze, 2004). O acetato de isoamilo, por exemplo, foi identificado na cerveja das barricas sempre a uma concentração inferior (entre 83 $\mu\text{g/L}$ a 556 $\mu\text{g/L}$) à detetada na cerveja controlo (881 $\mu\text{g/L}$).

Dado que o aumento da pressão e o dióxido de carbono resulta numa diminuição do teor de ésteres, as diferenças observadas nas concentrações dos ésteres podem ser relativas ao facto de nas barricas a pressão e o dióxido de carbono serem muito elevados (Kunze, 2004). Tal foi observado durante o estágio das cervejas em barrica de carvalho em que era visível a dilatação das barricas devido à produção excessiva de CO_2 .

Por outro lado, alguns ésteres voláteis, tal como o succinato de dietilo, o lactato de etilo e o malato de dietilo são sintetizados durante o envelhecimento em barrica de carvalho (Simpson, 1980). A análise das concentrações obtidas para esses componentes nas amostras (Tabela 5) corrobora essa ideia uma vez que se verifica que a concentração de lactato de etilo e succinato de dietilo no controlo é praticamente nula (2 $\mu\text{g/L}$ e 6 $\mu\text{g/L}$, respetivamente), enquanto nas cervejas maturadas em barricas foram identificadas quantidades bastante elevadas, nas gamas 685 $\mu\text{g/L}$ a 2749 $\mu\text{g/L}$ e 406 $\mu\text{g/L}$ a 1464 $\mu\text{g/L}$ respetivamente. A concentração de malato de dietilo nas amostras das barricas variou entre 67 $\mu\text{g/L}$ a 503 $\mu\text{g/L}$, enquanto no controlo não foi detetado.

Esta hipótese é sustentada por Simpson (1980) na medida em que detetou elevadas concentrações de lactato de etilo, succinato de dietilo e malato de dietilo em vinhos do Porto. As concentrações elevadas destes ésteres, identificados em todas as cervejas maturadas em barricas, podem ser correlacionadas com reações de esterificação que ocorrem lentamente no vinho a pH e temperaturas baixas durante a maturação.

Comparando os valores de concentração obtidos para estes ésteres, verifica-se que o lactato de etilo é o que se encontra mais presente nas amostras. Como foi observado na Figura 13 o ácido láctico foi dos ácidos orgânicos que se encontrou com maior concentração nas amostras, o que induz a afirmar que a reação de esterificação entre um álcool e o ácido láctico vai resultar na formação de lactato de etilo (Simpson, 1980).

Os derivados de furanos são de particular interesse uma vez que representam um grande grupo de compostos sujeito a mudanças de concentração durante o envelhecimento da cerveja (Vanderhaegen *et al.* 2006). Nas cervejas analisadas foram identificados alguns derivados de furanos tais como, o furfural, o 5-hidroxi-metil-furfural (HMF), o 5-metil-furfural e o álcool furfurílico.

Pela análise da Tabela 5 verifica-se que o furfural foi identificado em todas as amostras (4 µg/L a 81 µg/L) exceto no controlo, enquanto o 5-hidroxi-metil-furfural (HMF) e o 5-metil-furfural foram identificados em apenas algumas cervejas. Na barrica 6 foi identificado 5 µg/L de HMF e 3 µg/L de 5-metil-furfural. O 5-metil-furfural foi também encontrado na barrica 4 e no controlo a 3,1 µg/L e 1,5 µg/L, respetivamente. Além da barrica 6, o HMF foi também identificado na barrica 2 numa pequena concentração de 1 µg/L.

As concentrações de furfural e HMF podem aumentar com o tempo a uma taxa aproximadamente linear. Foi encontrada uma correlação entre o seu aumento e os *scores* sensoriais de sabor a rançoso. Logo, estes compostos podem ser utilizados como indicadores de deterioração do sabor da cerveja. Apesar das concentrações identificadas serem baixas, pelos efeitos referidos, deve ser prestada uma especial atenção à barrica 1, 2 e 5 com o intuito de preservar as qualidades da cerveja (Vanderhaegen *et al.* 2006).

Estes compostos, produzidos a partir de fontes de hidratos de carbono por aquecimento e armazenamento a longo prazo, foram também identificados por Simpson (1980) em vinhos do Porto.

A presença destes componentes voláteis no vinho do Porto resulta dos elevados níveis de açúcar residual (principalmente frutose e glucose), que proporcionam uma fonte substancial para a sua dedução. Além disso, o 5-HMF e o furfural são também originados durante o aquecimento (degradação da celulose e hemicelulose) ao qual a madeira é submetida durante a fase de fabricação de barris, sendo posteriormente incorporados pelo vinho no contacto com a madeira (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

A redução em compostos de furfurilo tem sido associada à redução de ambos os compostos bioquímicos para os álcoois correspondentes, álcool furfurílico e álcool 5-metil-furfural (Rodríguez-Rodríguez & Gómez-Plaza, 2012).

Por outro lado, as concentrações baixas de furfural e dos seus derivados podem estar relacionadas com a produção do barril, incluindo o tipo de madeira, ou com a capacidade das cervejas para extrair os compostos furânicos de barris de madeira (Fernández de Simón *et al.* 2003).

Em relação ao 5-HMF, como foi identificado em duas barricas atestadas há menos de 3 meses, pode significar que nas outras barricas já sofreu reações bioquímicas e químicas com outros compostos contribuindo para a perda deste componente na cerveja.

A presença de álcool furfurílico é notória em todas as amostras, com concentrações a variar de 89 µg/L a 354 µg/L, sendo que a cerveja controlo apresenta uma concentração e 138 µg/L. A identificação deste composto não está relacionada a uma extração a partir da madeira de carvalho, uma vez que nesta foram encontradas concentrações insignificantes de álcool furfurílico (Fernández de Simón *et al.* 2003). A sua origem está relacionada com a redução biológica de furfural para o álcool correspondente (Rodríguez-Rodríguez & Gómez-Plaza, 2012). Dos dados constantes na Tabela 5 verifica-se que grande parte do furfural das barricas 5 e 6 foi reduzido a álcool furfurílico. Por outro lado, nas barricas 1 e 2, embora se tenham formado quantidades apreciáveis de álcool furfurílico, foram conservadas significativas concentrações de furfural. Tendo em conta o ambiente da barrica 2, é normal que nesta a atividade microbiana seja maior e conseqüentemente se verifique uma maior formação de álcool furfurílico. A barrica 1 é aquela que apresenta uma maior concentração de furfural e uma vez que já foi atestada há mais de 12 meses pode afirmar-se que a atividade microbiana é menor, não tendo sido capaz de reduzir todo o ácido furfurílico.

Os compostos whiskey lactona I e whiskey lactona II, não detetáveis na cerveja controlo, foram identificados em todas as cervejas maturadas em barrica de carvalho (na gama 4 µg/L a 12 µg/L e 11 µg/L a 71 µg/L, respetivamente). Este resultado vem reforçar o impacto do armazenamento das cervejas em barrica de carvalho, uma vez estas duas whiskey lactonas foram identificadas por Masuda & Nishimura (1971) em extratos de vários *Quercus spp.*, como sendo os principais componentes da fração volátil de extrativos de madeira de carvalho.

Comparando os resultados obtidos para estes compostos nas barricas 1 e 4, verifica-se que no caso da primeira a concentração de whiskey lactona I (12 µg/L) é superior à concentração de whiskey lactona II (11 µg/L), enquanto na barrica 4 a concentração de whiskey lactona I (9 µg/L) é bastante inferior à concentração de whiskey lactona II (71 µg/L). Estas diferenças podem ser justificadas pelas possíveis diferenças entre as madeiras utilizadas na fabricação do barril, facto que foi confirmado noutros trabalhos que descrevem uma relação mais próxima entre as concentrações de whiskey lactonas em vinhos envelhecidos em madeira seca do que nos vinhos envelhecidos em madeira tostada (Fernández de Simón *et al.* 2003).

O maltol e furaneol foram detetados em todas as amostras analisadas. Estes dois compostos resultam da reação química entre açúcares redutores e as proteínas, péptidos, aminoácidos ou aminas, sendo classificadas de reações *Maillard*. Esta reação pode criar centenas de compostos aromatizantes diferentes de acordo com o tipo de aminoácido envolvido na reação. As condições ideais para a reação de *Maillard* ocorrem aquando da alta temperatura de torrefação de grão (maltado ou não) (Barth, 2013). Determinados sabores e cores característicos de certos estilos de cerveja são propiciados por reações *Maillard*, como é o caso da *Belgian Dark*.

Por outro lado, o maltol pode também ser encontrado na camada de madeira tostada em barris, notando-se um aumento da sua concentração durante os primeiros 12 meses de envelhecimento.

Na barrica 1 verifica-se que a concentração de maltol, 181 µg/L, é superior à do controlo, 121 µg/L, o que é expectável uma vez que, tendo sido atestada há mais de 12 meses, além das reações de *Maillard* ocorridas na torrefação do malte poderá ter ainda conseguido extrair da madeira este composto, aumentando assim a sua concentração.

O 4-vinilguaiacol foi extraído nas barricas 3, 4 e 6 em concentrações muito baixas, 0,8 µg/L, 0,1 µg/L e 0,7 µg/L, respetivamente. O resultado é normal dado que este composto está presente em baixas concentrações em madeira de carvalho (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Foram também detetados 4-etilfenol e 4-etilguaiacol em todas as cervejas maturadas em barrica de carvalho. Estes dois compostos estão presentes em quantidades residuais na madeira de carvalho, mas podem atingir valores próximos dos limites de deteção olfativos (180 µg/L para o primeiro e 110 µg/L para o segundo) em vinhos envelhecidos por longos períodos, representando um problema grave (Fernández de Simón *et al.* 2003). Observa-se que no caso das barricas 2 e 5, o 4-etilguaiacol ultrapassa os limites de deteção, aumentando, conseqüentemente, os aromas desagradáveis descritos como fenólicos/medicamentos (Fernández de Simón *et al.* 2003).

A concentração excessiva deste componente poderá ter origem bacteriana, mais especificamente devido à presença elevada de *Brettanomyces/Dekkera* no meio, capaz de sintetizar fenóis etílicos, principalmente, 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, a partir dos ácidos *p*-cumárico e ácido ferúlico (Jackson, 2008). Assim, o teor destes compostos vem reforçar o anteriormente constatado para a microflora das barricas.

Verifica-se que o 4-etilfenol foi encontrado na barrica 2 com uma concentração bastante superior às obtidas para as restantes amostras. Devido às condições microbiológicas da barrica é natural que exista

um maior crescimento de microrganismos indesejáveis, tais com *Brettanomyces*, resultando num aumento 4-etilfenol.

Conforme consta na Tabela 5, verifica-se a identificação do eugenol apenas na barrica 3 e numa concentração muito baixa, 2,6 µg/L. O eugenol tem sido particularmente associado a vinhos envelhecidos em barricas de carvalho, sendo extraído da madeira durante o período de envelhecimento. O eugenol é mais estável do que aldeídos fenólicos (López *et al.* 1999). Por conseguinte, a concentração deste composto depende unicamente na medida em que ele é extraído.

Segundo Fernández de Simón *et al.* (2003), este composto foi extraído de madeira, mostrando aumentos significativos entre 6 e 12 meses de envelhecimento. Esta pode ser a razão pela qual o eugenol não foi identificado nas barricas 2, 5 e 6, uma vez que as análises foram realizadas 3 meses depois de serem atestadas. A inexistência de eugenol nas outras amostras poderá estar relacionado com o facto de nas barricas correspondentes a essas amostras, o eugenol já se ter esgotado devido a reutilização do barril.

A presença do álcool terpénico linalol foi observada em todas as amostras, com concentrações a variar entre 98 µg/L e 181 µg/L. A origem deste composto está associada às flores de lúpulo utilizadas para a produção da cerveja, sendo parte influente do aroma a lúpulo na bebida. Ao longo dos últimos anos, muitos cervejeiros e grupos de pesquisa têm procurado usar o linalol como marcador para a avaliação das qualidades e quantidades de aromas de lúpulo (Papazian, 2006).

O linalol também tem sido caracterizado por desempenhar um papel importante no aroma do vinho, sendo derivado de uvas. Assim, este composto poderá ter sido absorvido pelas cervejas através das borras de vinho do Porto anteriormente confeccionado nas barricas utilizadas neste estudo. Isto poderá justificar o facto das concentrações de linalol serem superiores nas cervejas maturadas em barrica de carvalho, como no caso das barricas 1, 3 e 4 (Bakker & Clarke, 2012).

O siringaldeído, obtido a partir da quebra da lenhina durante a torrefação da madeira, foi identificado nas barricas 1, 3 e 4 a 25 µg/L, 17 µg/L e 2 µg/L, respetivamente. A ausência do siringaldeído nas outras cervejas maturadas em barricas de carvalho poderá significar que as barricas são originadas de tipos de madeira diferente, que foram sujeitas a processos de tosta diferentes e consequentemente provocou uma diferença na quantidade de fenóis voláteis/siringaldeído (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Para além disso, o siringaldeído poderá ainda ser extraído durante o processo de envelhecimento, uma vez que as barricas 1, 3 e 4 já estagiaram por um período superior a 12 meses, enquanto as barricas 2, 5 e 6 estão somente há 2 meses.

O composto volátil 1,1-Dietoxipropan-2-ona foi identificado nas barricas 3, 4, 5 e 6 nas concentrações de 18 µg/L, 19 µg/L, 24 µg/L e 24 µg/L respectivamente. Este composto foi identificado por Simpson, (1980) em Vinhos do Porto, havendo evidências de que as concentrações mais elevadas ocorreram em armazenamentos mais longos. A identificação deste composto fundamenta a incorporação de aromas características do vinho do Porto na cerveja.

Os ácidos voláteis tais como o ácido hexanóico, o ácido decanóico e o ácido octanóico foram encontrados nas amostras de cerveja analisadas. A presença destes ácidos nas amostras é resultante da fermentação pela levedura, no entanto qualquer excesso existente é provável que tenha sido produzido por outros microrganismos presentes nas barricas (Jackson, 2008). Isto justifica o facto de se observar um aumento das concentrações destes ácidos nas cervejas maturadas em barricas de carvalho.

4.4 Análise Sensorial

Os *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas maturadas em barrica de carvalho foram sujeitos a uma prova de análise sensorial.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 apresentam os perfis obtidos, através da análise sensorial, para cada amostra analisada, em perceções separadas e relacionadas com a aparência, aroma/odor, sabor e qualidade, respetivamente.

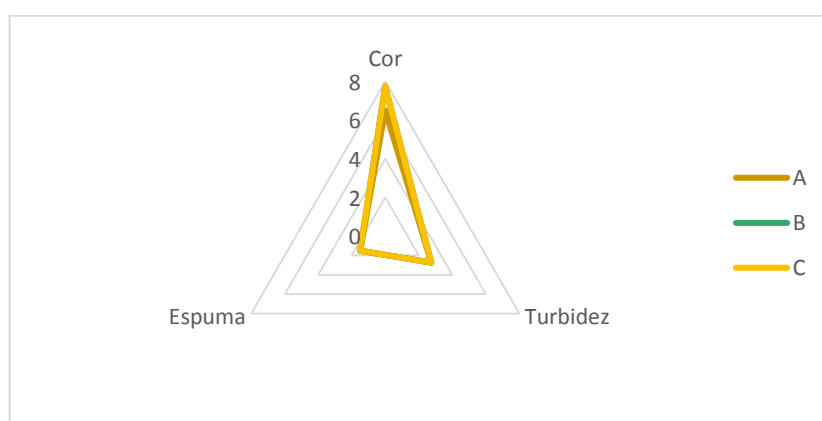


Figura 14 – Perfil de aparência de cada um dos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Em relação a aparência das cervejas analisadas, Figura 14, verificou-se que as três amostras apresentaram uma aparência muito similar, particularmente as amostras B e C, que receberam o mesmo

score para todos os atributos. Apenas a amostra A diferiu no atributo da cor, revelando uma cor menos intensa do que as anteriores.

No que diz respeito ao atributo relacionado com a espuma da cerveja, este foi o que obteve o menor *score* por parte dos provadores devido à ausência de espuma ou à presença de espuma pouco estável. Este resultado está associado ao facto de estas cervejas terem sido produzidas em barrica, onde apesar de ser produzida uma grande quantidade de CO₂, este era extraído. De forma a melhorar a qualidade da espuma, principalmente tendo em conta o seu significado para a qualidade global da cerveja, poderão ser consideradas duas hipóteses: transferir a cerveja para a cuba de modo a ser carbonatada ou então considerar o método de *priming* que consiste em adicionar material fermentescível com o objetivo de realizar uma refermentação em garrafa, na qual será originado CO₂.

Quanto à turbidez verificou-se que as cervejas analisadas apresentaram-se equivalentes para este atributo, sendo ligeiramente turvas, perfil que é normal de uma cerveja artesanal.

No que diz respeito ao perfil aromático das amostras, Figura 15, é possível observar certas similiaridades em determinados atributos bem como, assinalar diferenças entre elas.

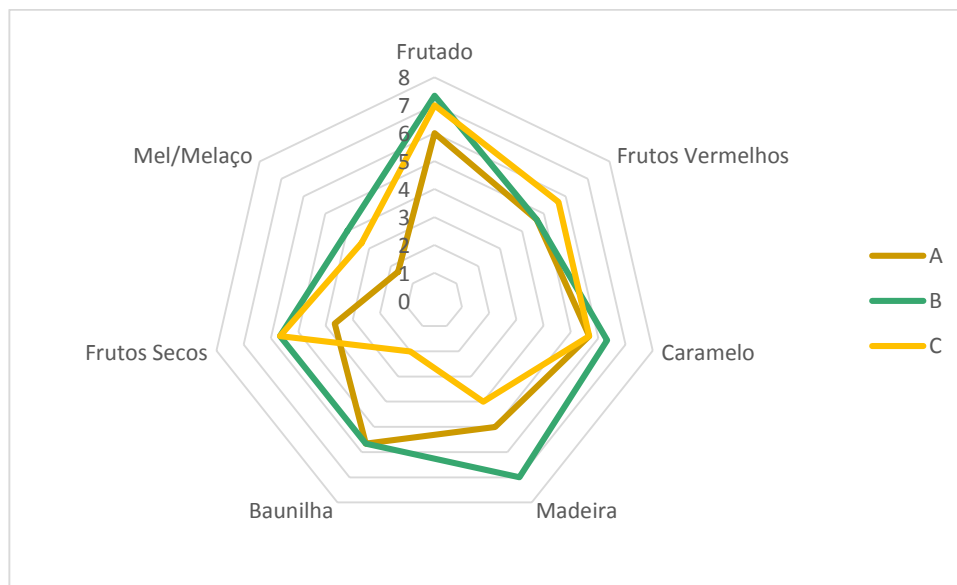


Figura 15 – Perfil aromático de cada um dos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Em relação à amostra A é possível observar similaridade nos atributos aromáticos desta amostra com diversos atributos aromáticos da amostra B, sendo eles a baunilha, caramelo e frutos vermelhos. Diferindo no que diz respeito ao frutado, frutos secos e mel/melaço.

As amostras A e C são similares para os atributos frutado, frutos secos e caramelo e diferem nos atributos frutos vermelhos, mel/melaço e baunilha.

As amostras B e C são idênticas no que diz respeito ao mel/melaço, frutos secos e caramelo, diferem nos atributos frutado, frutos vermelhos e baunilha.

As cervejas *Belgian Dark* são caracterizadas por um aroma complexo, sentindo-se inicialmente um sabor doce, conferido por chocolate e grãos de café torrado, e um intenso e distinto amargor final. São caracterizadas por notas de caramelo/torrado, frutos secos e moderadamente picante.

De acordo com um estudo sobre o perfil sensorial do vinho do Porto, os principais atributos descritos para o vinho do Porto são mel/melaço, madeira, sabor doce, sensação alcoólica, frutos vermelhos, floral, frutos secos e citrinos (Vilela *et al.* 2015).

Pela análise do perfil das características aromáticas é possível observar que a amostra A foi aquela que menos assumiu as características aromáticas do vinho do Porto, na medida em que se observa que é aquela em que os atributos característicos do vinho do Porto tais como mel/melaço, frutos secos, madeira, caramelo e frutos vermelhos menos se revelaram. As amostras B e C foram as que obtiveram maior cotação nos atributos característicos do vinho do Porto. No entanto, para todos os atributos, com exceção do aroma a “frutos vermelhos”, a amostra B foi a que obteve uma maior pontuação, isto é, foi aquela que mais se aproximou das características do Vinho do Porto.

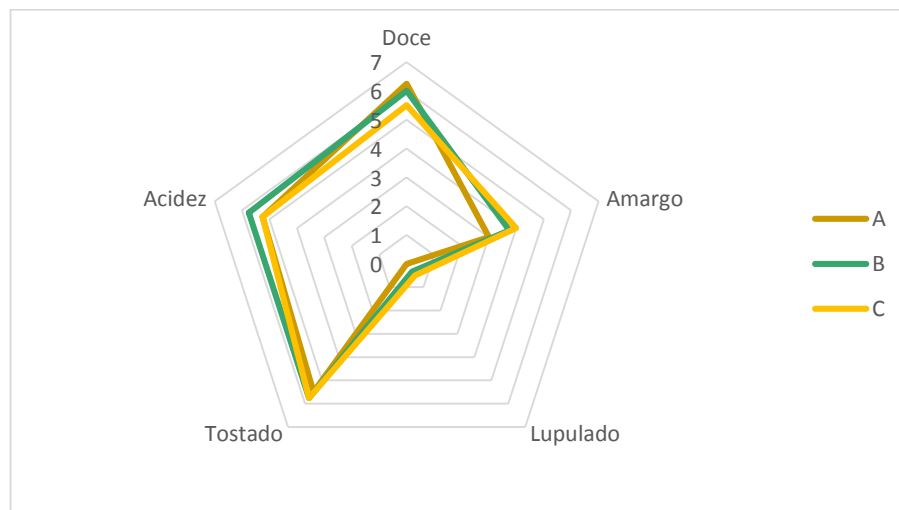


Figura 16 – Perfil de sabor de cada um dos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Quanto ao perfil de sabor das amostras analisadas, Figura 16, verifica-se que os atributos de sabor mais presentes nas amostras foram o sabor tostado, idêntico em todas as amostras, o doce, mais intenso na amostra A, seguida da amostra B e C e o sabor ácido, mais acentuado na amostra B.

Em relação ao sabor amargo, constata-se uma intensidade similar deste atributo nas amostras B e C enquanto a amostra A apresenta um amargor menos intenso.

O atributo de sabor menos pontuado foi o lupulado, sendo classificado pelos provadores como inexistente na amostra A e muito pouco intenso nas amostras B e C.

Quanto ao perfil dos atributos gerais de qualidade, Figura 17, as três amostras apresentam similaridade no que diz respeito à qualidade visual global e *overall rating* notando-se mesmo assim diferenças por ordem decrescente de qualidade, B, A e C. No que toca à qualidade gustativa global, a amostra A e C são idênticas, enquanto a B destaca-se destas duas pela positiva. A característica diferenciadora entre as amostras é a qualidade aromática global, já que as amostras A e B são similares enquanto a amostra C difere das outras duas, obtendo um *score* mais baixo.

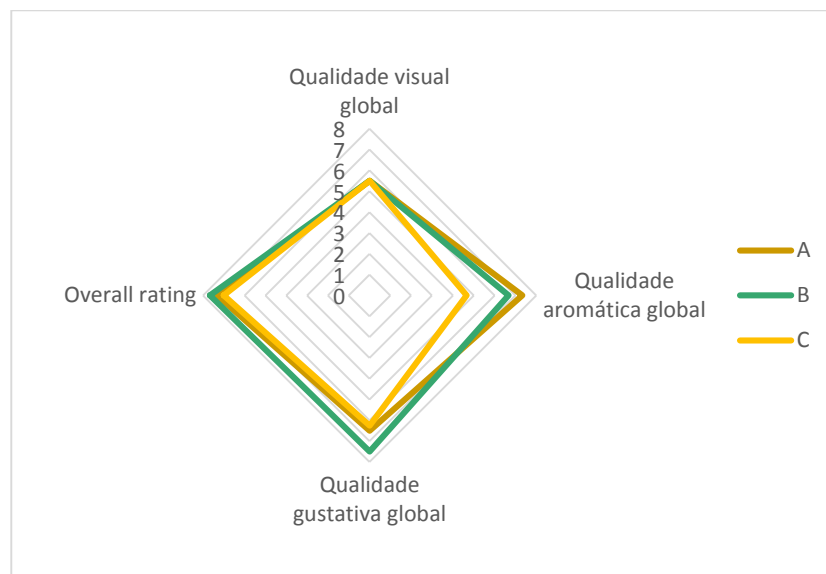


Figura 17 – Perfil de qualidade de cada um dos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Considerando estes resultados é possível concluir que cada um dos *blends* analisados reúne, ao nível da qualidade global do produto, as particularidades necessárias para atrair o consumidor. Pode ainda inferir-se que a amostra B, tanto pela qualidade aromática como pela qualidade gustativa global, é aquela que suscitaria maior interesse na medida em que é a cerveja com maior qualidade. Por outro lado a C, não obstante de ser uma cerveja interessante, seria a menos apreciada.

4.5 Compostos maioritários nos *blends*

Os *blends* A, B e C obtidos a partir da formulação de misturas das barricas existentes foram quantificados quanto aos compostos maioritários, etanol e ácidos orgânicos, Figura 18 e Figura 19, respetivamente.

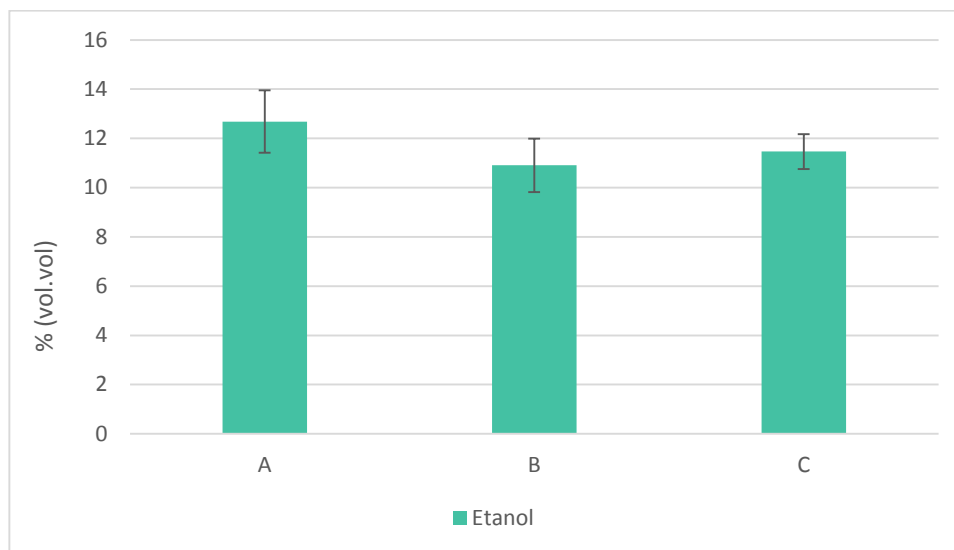


Figura 18 – Concentração de etanol (vol./vol.) nos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Pela análise do gráfico da Figura 18, verifica-se que o teor alcoólico dos *blends* é aproximadamente o mesmo, com valores entre 10 % vol. e 14 % vol.

Estes resultados são concordantes com os teores alcoólicos finais quantificados nas barricas, como ilustra a Figura 12.

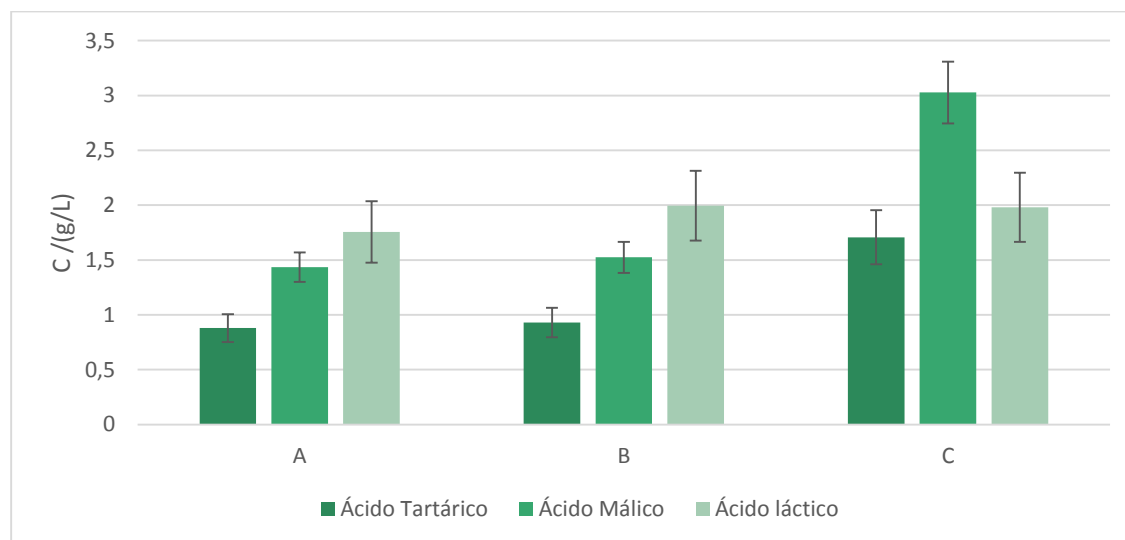


Figura 19 – Concentração de ácidos orgânicos nos *blends* analisados, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes.

Pela análise do gráfico da Figura 19, observa-se que as concentrações dos ácidos orgânicos foram semelhantes nos *blends* A e B, com valores correspondentes com os que foram quantificados nas barricas. As concentrações de ácido tartárico e málico no *blend* C são superiores às quantificadas nas amostras A e B, uma vez que o fator diferenciador entre as composições das barricas é a barrica 5, e esta não apresentou uma concentração destes compostos (Figura 13) justificativa deste aumento, pelo que a quantificação pode ter sido afetada por algum erro de análise.

4.6 Compostos minoritários nos *blends*

A Tabela 6 apresenta as concentrações dos compostos voláteis identificados nos *blends* estudados.

Os ácidos voláteis tais como o ácido hexanóico, decanóico, octanóico e vanílico foram encontrados nas amostras dos *blends* analisados.

A maioria dos ácidos presentes nas amostras é resultante da fermentação pela levedura. Alguns destes ácidos têm odores distintivos, como é o caso dos ácidos hexanóico, octanóico e decanóico que podem ser responsáveis por *off-flavors* em cerveja descritos como ácidos gordos, óleos vegetais, ranço e queijo (Jackson, 2008). Através dos resultados obtidos, Tabela 6, observa-se que as concentrações obtidas para os ácidos hexanóico e octanóico foram superiores aos limites de detecção. No entanto, os aromas acima referidos não foram detetados na prova sensorial.

O ácido vanílico, identificado na amostra B, é um fenólico derivado do carvalho, mais propriamente gerado a partir da degradação da lenhina. Este composto, tal como outros gerados a partir de carvalho, contribui para a qualidade sensorial da bebida com um aroma de baunilha (Bakker & Clarke, 2012). A ausência deste composto na amostra C apoia os resultados obtidos na análise sensorial uma vez que, o atributo de baunilha não foi descrito pelos provadores nesta amostra. No entanto, a amostra A obteve o mesmo *score* da amostra B para o atributo baunilha, ou seja, deveria ter sido identificado o ácido vanílico nesta amostra. No entanto, o atributo baunilha na amostra A poderá estar associado a outro composto.

Os álcoois superiores, provenientes da fermentação, são particularmente importantes, sendo eles o 1-pentanol, o 3-metilbutanol e o 2-metilbutanol. Estes álcoois foram somente encontrados na amostra C.

De acordo com Rapp & Versini (1996) as concentrações de álcoois superiores abaixo de 300 mg/L são desejáveis por adicionar complexidade ao vinho, enquanto concentrações mais elevadas podem ser prejudiciais para a qualidade do vinho. No entanto, nenhum dos compostos identificados ultrapassa essa concentração, portanto não é esperada uma influência negativa na qualidade da cerveja.

Tabela 6 – Concentrações ($\mu\text{g/L}$) dos compostos voláteis minoritários detetados nos *blends* A, B e C, obtidos a partir da formulação de misturas das cervejas das barricas existentes e respetivos limites de deteção ($\mu\text{g/L}$)

	A	B	C	LIMIAR DE PERCEÇÃO ($\mu\text{g/L}$)	DESCRITOR AROMÁTICO
Acetato de isoamilo	845,5	167,9	134,0	1200 [11]c	Banana [1]
Butirato de etilo	240,7	158,8	164,1	20 [1]b	Papaia, adocicado, maçã [2]
Hexanoato de etilo	267,3	212,9	197,4	210 [11]c	Frutado, maçã verde [2]
Lactato de etilo	1054,2	1041,9	993,8	25000 [11]c	Morango, framboesa, perfumado [2]
Octanoato de etilo	319,2	256,3	237,6	900 [11]c	Maçã, frutado, doce [2]
Succinato de dietilo	740,9	829,2	825,6	1200 [11]c	
Malato de dietilo	415,1	407,7	362,2		
2-metil-1-propanol	619,9	469,7	498,8		
1-hexanol	147,6	130,4	128,9		
Z3-hexenol	12,1	9,2	9,3	400 [1]b	Relva [2]
3-etoxi-1-propanol	5,9	5,1	4,4		
2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol	n.d.	n.d.	2,8		Banana [8]
1-octanol	18,7	15,9	16,2	10000 [10]b	Coco, nozes, oleoso [4]
Álcool furfurílico	142,5	120,4	132,3	1000 [2]a	Palha, mofo [6]
Furfural	1,6	10,9	10,8	15000 [11]d	Amêndoa torrada [8]
1-butanol	112,5	952,3	102,6	590 [4]a	Maltado, Solvente, linhaça [3]
1-propanol	n.d.	n.d.	24,9		Batata cozida [8]
Metionol	54,5	44,3	35,6	36 [3]a	Amargo, químico [4]
Tirosol	12,4	26,9	19,9		Anis, terpeno, limão [3]
Linalol	165,4	150,5	138,2	25 [5]d	Cravo-da-índia [6]
Eugenol	1,4	0,6	0,9	15 [6]d	Farmacêutico, estábulo [10]
4-etilguaiaicol	6,7	13,1	13,1	110 [10]d	Farmacêutico, estábulo [10]
4-etilfenol	n.d.	12,1	8,7	180 [6]d	Fenólico, amargo, farmacêutico [7]
4-vinilguaiaicol	0,9	0,5	0,7	21 [3]a	Fenólico, amargo, farmacêutico [7]
Ácido 3-metil-butírico	130,9	119,3	110,8	33 [4]d	Gorduroso, rançoso [5]
Ácido hexanóico	866,6	654,1	577,7	420 [4]d	Queijo, óleo vegetal, suado [3]
Ácido decanóico	97,7	139,3	148,9	1000 [4]d	Cera, sebo, rançoso, sabão [4]
Ácido octanóico	1717,8	1908,6	1595,7	500 [9]d	Ranço, óleo vegetal, suado [4]
Ácido vanílico	n.d.	1,5	n.d.		
Siringaldeído	n.d.	0,9	11,6		
5-hidroximetilfurfural (5-HMF)	8,9	10,1	9,3		
Whiskey lactona I	1,0	6,1	n.d.		Coco, carvalho [8]
Whiskey lactona II	34,4	31,3	30,2		Coco, carvalho [8]
γ -caprolactona	12,4	15,6	13,2		
γ -nonalactona	112,5	131,7	128,6		Coco, doces frutados, baunilha [9]
3-metil-2(5H)-furanona	1,9	1,7	n.d.		
Furaneol	17,8	13,1	10,0	10 [12]a	Caramelo [3]
1,1-dietoxipropan-2-ona	n.d.	n.d.	17,2		
Maltol	78,3	100,0	85,5	35000 [3]a	Caramelo, torrado [3]

n.d. – não detetado

[1] (Guth, 1997); [2] (Siebert *et al.* 2005); [3] (Czerny *et al.* 2008); [4] (Meilgaard, 1975); [5] (Escudero *et al.* 2004); [6] (Boidron *et al.* 1988); [7] (Boutou & Chatonnet, 2007); [8] (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006); [9] (López *et al.* 1999); [10] (Moreno-Arribas & Polo, 2009); [11] (Moll *et al.* 1994); [12] (Bakker & Clarke, 2012).

a) Limiar de perceção olfativa em água; b) Limiar de perceção olfativa em solução água-álcool; c) Limiar de perceção olfativa em cerveja; d) Limiar de perceção olfativa em vinho

O facto destes álcoois não terem sido encontrados nas amostras A e B pode estar relacionado com o tempo em que as barricas que compõem estes *blends* foram atestadas, uma vez que já foi há mais de 12 meses, já deverão ter ocorrido reações químicas que transformaram os álcoois nos seus ésteres característicos. Isto pode ser comprovado pelas concentrações de acetato isoamilo detetadas, Tabela 5. Através destas concentrações observa-se que a amostra C é a que tem a menor concentração de acetato de isoamilo, 134 µg/L, enquanto a amostra A é a que tem uma concentração significativamente superior às outras, 846 µg/L. Estes valores poderão indicar que nesta amostras os álcoois já foram reduzidos a ésteres.

As whiskey lactonas foram detetadas nas três amostras, à exceção de whiskey lactona I que não foi encontrada na amostra C. Tendo em consideração as concentrações obtidas para este composto nas barricas 1, 3 e 4 (composição amostra C, Tabela 4), Tabela 5, era esperado que whiskey lactona I fosse identificada na amostra C.

O mesmo não aconteceu em relação às amostras A e B, no entanto é possível verificar que as concentrações obtidas foram muito baixas comparativamente às obtidas nas barricas que as compõem.

No que diz respeito às whiskey lactonas II verificou-se que as concentrações obtidas para as amostras A, B e C foram semelhantes, 34 µg/L, 31 µg/L e 30 µg/L, respetivamente.

O aroma destes dois compostos tem vindo a ser descrito como a fonte do odor típico do envelhecimento em barril de carvalho, descrito como “carvalho” e “coco” (Fernández de Simón *et al.* 2003).

A análise sensorial realizada apoia os resultados obtidos na medida em que, se verificou que o aroma a madeira era mais intenso na amostra B, seguido da amostra A e posteriormente na amostra C, Figura 15.

O maltol foi encontrado nas amostras A, B e C nas concentrações de 78 µg/L, 100 µg/L e 85 µg/L, respetivamente. As diferenças entre as concentrações obtidas vão de encontro à composição de cada um dos *blends*. Por exemplo, a amostra A foi a que teve uma menor concentração mas essa concentração vai ao encontro da sua constituição, 50 % da barrica 3 e 50 % da barrica 4, em que como foi visto anteriormente, Tabela 5, a barrica 3 foi aquela em que a concentração de maltol era menor. A presença deste composto confere à bebida aromas de caramelo e torrado (Barth, 2013). Os resultados obtidos fundamentam os resultados na análise sensorial, em que foi visto que para o atributo caramelo as amostras A e C obtiveram a mesma cotação, sendo inferior à obtida pela amostra B.

Os fenóis 4-etilguaiaicol, 4-etilfenol e 4-vinilguaiaicol foram identificados nas três amostras, à exceção do 4-etilfenol que não foi detectado na amostra A.

Quando comparados os valores obtidos para os *blends*, Tabela 6, com os valores obtidos para as barricas, Tabela 5, verifica-se uma diferença significativa entre eles, sendo as concentrações determinadas nos *blends* muito inferiores às das barricas.

Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), os fenóis 4-vinilfenol, 4-vinilguaiaicol, 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol são considerados como indicadores de um defeito olfativo importante, conhecido como fenólico/medicamento, que ocorre, com alguma frequência (Fernández de Simón *et al.* 2008). Este aroma não foi identificado pelos provadores na prova sensorial e observando os limites de detecção verifica-se que as concentrações obtidas são inferiores a estes.

O furfural, 5-HMF e álcool furfurílico foram identificados nas amostras analisadas, Tabela 6. De acordo com as concentrações obtidas para o furfural e o álcool furfurílico, verifica-se que a maior parte do furfural existente nas amostras já foi reduzido a álcool furfurílico, principalmente na amostra A. Este resultado vai de encontro ao esperado dado que esta amostra é composta pelas mesmas percentagens de barrica 3 e 4, que foram atestadas há mais tempo, tornando mais provável este tipo de reações.

O monoterpeneo linalol foi encontrado nas amostras A, B e C nas concentrações de 165 µg/L, 151 µg/L e 138 µg/L, respetivamente. Tendo em atenção o limite de detecção, 25 µg/L, verifica-se que as concentrações obtidas são superiores o que vai fazer com que o aroma floral se destaque nas cervejas. Apesar disso, esse não foi um dos aromas com mais *score* identificado pelo painel de provadores.

5 CONCLUSÃO

A finalidade deste projeto firma-se com o estudo do processo de estágio de cerveja artesanal em barrica de carvalho, previamente utilizada no envelhecimento do vinho do Porto. O intuito foi perceber em que medida é que a madeira de carvalho influencia as propriedades organoléticas da cerveja. Para isso, procedeu-se à caracterização química e microbiológica de seis cervejas maturadas em barricas de carvalho, a partir das quais se procedeu à formulação de três *blends* que posteriormente foram analisados química e sensorialmente.

Do ponto de vista microbiológico, constatou-se a presença de *Brettanomyces* e bactérias lácticas nas cervejas em estágio em barrica de carvalho há, aproximadamente, 3 meses.

Da quantificação dos compostos maioritários, verificou-se que as cervejas maturadas em barrica obtiveram um teor de álcool final superior à cerveja controlo. A análise dos ácidos orgânicos indicou a existência de concentrações de ácido tartárico, málico e láctico em todas as cervejas maturadas em barrica de carvalho.

A análise dos compostos minoritários, realizada por GC-MS, indicou a presença de compostos característicos de bebidas maturadas em barrica de carvalho, em particular do Vinho do Porto. Entre os compostos detetados nas amostras, destacam-se o lactato de etilo, succinato de etilo, eugenol, guaiacol, whiskey lactona I e whiskey lactona II, maltol e os derivados de furanos (furfural, 5-hidroximetil-furfural (HMF), o 5-metil-furfural e o álcool furfurílico).

No que concerne à análise sensorial, apurou-se que os atributos mais pontuados pelos provadores nas amostras foram o frutado, frutos vermelhos, mel/melaço, frutos secos, baunilha, madeira e caramelo. Estes atributos espelham o processo de maturação a que as cervejas foram sujeitas, quer seja pela transferência das características aromáticas da madeira como das características do Vinho do Porto. Tendo em consideração as características aromáticas do Vinho do Porto, pode inferir-se que a amostra B foi a que mais se aproximou dessas características.

Em suma, foi possível concluir que o estágio de cerveja artesanal em barrica de carvalho, previamente utilizada no envelhecimento de vinho do Porto, redundou numa cerveja com características únicas, aumentando a sua complexidade organolética. Durante o estágio ocorreram um conjunto de interações químicas entre a barrica, o meio envolvente e a cerveja, culminando numa transformação da cerveja final, tanto quanto ao sabor como quanto à composição da bebida.

CONCLUSÃO

Esta cerveja denota grande potencial na medida em que, sendo a cerveja uma das bebidas mais apreciadas no mundo e o vinho do Porto uma das bebidas mais distintas, agrega o melhor destes “dois mundos”. A atual procura de cervejas diferentes do usual, de cervejas aromaticamente ricas e especiais enaltece a virtualidade desta cerveja, desde o processo de produção ao momento da degustação.

BIBLIOGRAFIA

- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, *41*, 214–224.
- Bakker, J., & Clarke, R. (2012). *Wine Flavour Chemistry* (2^a ed.). Oxford: A John Wiley & Sons.
- Barth, R. (2013). *The Chemistry of Beer: The Science in the Suds*. Wiley.
- Boidron, J., Chatonnet, P., & Pons, M. (1988). Effect of wood aroma compounds of wine. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, *22*(4), 275–294.
- Boutou, S., & Chatonnet, P. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, *1141*(1), 1–9.
- Brewers Association. (2014). Beer Style Guidelines. Obtido 25 de Setembro de 2015, de <https://www.brewersassociation.org/wp-content/uploads/2015/03/2015-brewers-association-beer-style-guidelines.pdf>
- Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R., & Boulton, C. A. (2004). *Brewing: Science and Practice* (England). England: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LCC.
- Briggs, D.E.; Boulton, C.A; Brookes, A.; Steves, R. (2004). Metabolism of wort by yeast. Em W. P. S. and C. P. LLC (Ed.), *Brewing: Science and Practice* (pp. 401–469). England.
- Charry-Parra, G., Dejesus-Echevarria, M., & Perez, F. J. (2011). Beer volatile analysis: optimization of HS/SPME coupled to GC/MS/FID. *Journal of food science*, *76*(2), C205–11.
- Cole, V. c., & Noble, A. c. (2003). Flavor Chemistry. Em A. G. H. Lea & J. R. Piggott (Eds.), *Fermented Beverage Production*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Cristovam, E., & Paterson, A. (2003). Port. Em B. Caballero, P. Finglas, L. Trugo (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 4630-4644). Baltimore: Academic Press.
- Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., ... Schieberle, P. (2008). Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *European Food Research and Technology*, *228*(2), 265–273.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M. A., Ortián, N., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3516–3524.
- Esslinger, H. M. (2009). Fermentation, Maturation and Storage. Em *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets* (pp. 207–224). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Esslinger, H. M., & Narziss L. (2003). Beer. Em *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Sanz, M., Poveda, P., Perez-Magariño, Ortega-Heras, M., ... González-Huerta, C. (2008). Volatile Compounds and Sensorial Characterization of Wines from Four Spanish Denominations of Origin, Aged in Spanish Rebollo (*Quercus pyrenaica* Willd.) Oak Wood Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9046–9055.
- Fernández de Simón, B., Hernández, T., Cadahía, E., Dueñas, M., & Estrella, I. (2003). Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 216(2), 150–156.
- Gresser, A. (2009a). Properties and Quality. Em *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Weinheim: wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Gresser, A. (2009b). Stability of Beer. Em H. M. Esslinger (Ed.), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Guth, J. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027–3032.
- Henning, J. (2006). The breeding of hop. Em C. W. Bamforth (Ed.), *Brewing*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press.
- Hernández-Artiga, M. & Dolores, M. (2009). The Evaluation of Beer Aging. Em V. R. Preedy (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 913–923). San Diego: Academic Press.
- Hogg, T. (2013). Port. Em F. Mencarelli & P. Tonutti (Eds.), *Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd.
- Hughes, P. (2009). Identification of Taste and Aroma-Active Components of Beer. Em V. R. Preedy (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 227–239). San Diego: Academic Press.
- IVDP. (2005). Regulamento n° 36/2005 - Regulamento das categorias especiais do Vinho do Porto. Em *Diário da República n° 51/05 - II Série* (pp. 7638–7640). Portugal: Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I. P.
- IVDP. (2015a). REGIÃO. Obtido 9 de Setembro de 2015, de <https://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=16>
- IVDP. (2015b). Introdução. Obtido 9 de Setembro de 2015, de <http://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=64>
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science. Principles and applications* (3ª ed.). London: Academic Press.
- Jackson, R. S. (2009). *Wine Tasting: A Professional Handbook* (2ª ed.). London: Academic Press.
- Jackson, R. S. (2014). Chemical Constituents of Grapes and Wine. Em *Wine Science* (pp. 347–426).

- Jarauta, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 4166–77.
- Kunze, W. (2004). *Technology brewing and malting* (3ª ed.). Berlin: VLB.
- LaVilla, J. (2010). *The Wine, Beer, and Spirits Handbook: A Guide to Styles and Service*. New Jersey: Wiley & Sons.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*.
- Letra. (2014). Cerveja Letra. Obtido 10 de Setembro de 2015, de <http://www.cervejalettra.pt/>
- Lewis, M. J., & Young, T. W. (2002). *Brewing* (2ª ed.). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Lindsay, S. (1997). *High Performance Liquid Chromatography* (2ª ed.). London: John Wiley & Sons.
- López, R., Ferreira, V., Hernández, P., & Cacho, J. F. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*, 1461–1467.
- Masuda, M., & Nishimura, K. (1971). Branched nonalactones from some Quercus species. *Phytochem*, *10*, 1401–1402.
- Meilgaard, M. (1975). Flavor chemistry of beer part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, *12*(3), 151–168.
- Moll, M. J., Blauwe, J., & T., W. (1994). *Beers and Coolers*. Intercept Ltd.
- Moreira, N., & Guedes de Pinho, P. (2011). Port wine. Em R. S. Jackson (Ed.), *Advances in food and nutrition research*, *63*, (pp. 119–146). London: Academic Press
- Moreno, J. A., Zea, L., Moyano, L., & Medina, M. (2005). Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, *16*(4), 333–338.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science+Business Media.
- Mosedale, J. R., & Puech, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, *9*(3), 95–101.
- Mosedale, J. R., & Puech, J. L. (2003). Barrels/Wines, Spirits, and Other Beverages. Em B. Caballero, P. Finglas, L. Trugo (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 383–403). Baltimore: Academic Press.
- Munroe, J. H. (2006). Fermentation. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (2ª ed., pp. 487–525). Boca Raton: Taylor & Francis Group.

- Nishimura, K., & Matsuyama, R. (1989). Maturation and Maturation Chemistry. Em *The Science and Technology of Whiskies* (pp. 253–363). London: Longman Scientific and Technical.
- Palmer, G. H. (2006). Barley and Malt. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (2^a ed.). Taylor & Francis Group, LLC.
- Papazian, C. (2006). Beer Styles: Their Origins and Classification. Em *Handbook of Brewing* (2^a ed.). Taylor & Francis Group, LLC.
- Papazian, C. (2006). Beer Styles: Their Origins and Classification. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Pérez-Juan, P. M., & Castro, M. D. L. (2015). Use of Oak Wood to Enrich Wine with Volatile Compounds. Em V. R. Preedy, *Processing And Impact On Active Components In Food* (pp. 471 – 480). London: Academic Press.
- Phillishkirk, G. (2006). Quality. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (2^a ed.). Taylor & Francis Group.
- Piggott, J. R., & Lea, A. G. H. (2003). *Fermented Beverage Production* (2^a ed.). New York: Springer Science+Business Media
- Portaria n° 1/96 de 3 de Janeiro. *Diário da República n° 2/96 - I Série - B*. Ministério da Economia; Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas.
- Preedy, V. R. (2009). *Beer in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press.
- Rapp, A., & Versini, G. (1996). Vergleichende Untersuchungen zum Gehalt von Methylantranilat. Em *Weinen von neueren pilzresistenten Rebsorten und vinifera-Sorten* (pp. 215–216). Foxton: Vitis.
- Reader, H. P. D. M. (2003). Fortified Wines: Sherry, Port and Madeira. Em J. R., Piggott, & A. G. H., Lea (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 157–190). New York: Springer Science+Business Media.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2^a ed.). England: John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. Chichester John Wiley (Vol. 2).
- Roberts, T., & Wilson, R. (2006). Hops. Em F. Priest & G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (2^a ed.). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-Da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 588–599.

- Rodríguez-Rodríguez, P., & Gómez-Plaza, E. (2012). Dependence of oak-related volatile compounds on the physicochemical characteristics of barrel-aged wines. *Food Technology and Biotechnology*, *50*(1), 59–65.
- Russell, I. (2006). Yeast. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (2ª ed., pp. 281–332). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Rutherford, A. G., Russell, I., Bathgate, G. N., Broadhead, A. L., & Brosnan, J. (2011). *Whisky: Technology, Production and Marketing. Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* (Vol. 36).
- Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia Of Food Microbiology* (2ª ed.). Oxford: Academic Press.
- Siebert, T. E., Smyth, H. E., Capone, D. L., Neuwhner, C., Pardon, K. H., Skouroumounis, G. K., ... Pollnitz, A. P. (2005). Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *381*(4), 937–947.
- Simpson, R. F. (1980). Volatile Aroma Components of Australian Port Wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *31*(March 1979), 214–222.
- Smiths detection. (2014). Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa. Obtido 1 de Setembro de 2015, de <https://www.smithsdetection.com/pt/tecnologias/gc-ms.html>
- Stewart, G. G. (2006). Adjuncts. Em F. G. Priest & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of Brewing* (pp. 161–177). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Teixeira, J. A., & Fonseca, M. M. da. (2007). *Reactores biológicos: fundamentos e aplicações*. Lisboa: Lidel Edições Técnicas.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*, *95*(3), 357–381.
- Vilela, A., Monteiro, B., & Correia, E. (2015). Sensory Profile Of Port Wines: Categorical Principal Component Analysis, An Approach For Sensory Data Treatment. *Journal of Viticulture and Enology*, *30*(1), 1-8.
- Williams, A. A., Lewis, M. J., & May, H. (1983). The volatile flavor components of commercial port wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *34*(3), 311–319.
- Wunderlich, S. & Back, W. (2009). Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. Em V. R. Preedy (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 1–16). San Diego: Academic Press.

