**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e
microbiológicos**

Luís Henrique Poletto Angeloni

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

Luís Henrique Poletto Angeloni
Licenciado em Ciências Biológicas

Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Angeloni, Luís Henrique Poletto

Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos / Luís Henrique Poletto Angeloni. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

94 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cerveja Ale 2. Envelhecimento 3. Barril de carvalho 4. Microrganismos 5. Análises químicas I. Título

CDD 663.42
A584c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, LÚCIA e JOÃO ANGELONI JÚNIOR,
irmãos RODRIGO e BRUNA,
meus avós maternos ARLINDO POLETO e LIA (in memorian),
paternos JOÃO ANGELONI e MARIA THEREZINHA (in memorian)
sogros Francis Cesar Mainardi e Jaciara Mansor de Oliveira
cunhado Francis Eduardo de Oliveira Mainardi
pelo amor e confiança.

Ofereço

A minha mulher JUNE e meus filhos LUIS
FELIPE e PAULO HENRIQUE pelo
incentivo, compreensão e amor durante
todos os momentos da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Angeloni Júnior e Lúcia Elena Poletto Angeloni por todo apoio familiar fundamental.

Ao meu orientador André Ricardo Alcarde pelo apoio em todas as etapas deste trabalho e convivência.

Aos amigos de laboratório Aline, Máfia, Carol, Cintra, Daniele e Giovanni.

Ao amigo e colega de pesquisa Cauré Barbosa Portugal pelo incentivo e apoio para conclusão desta pesquisa.

Aos camaradas Deboni, Menos Zum, Pega bola, Celsão e Ciniro.

Aos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Cachaça – LTQ2B.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, pela oportunidade e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Aos técnicos de laboratório, Silvino, Pedrinho e Rose.

A minha mulher June de Oliveira Mainardi pela parceria e amor.

Aos meus filhos Luis Felipe e Paulo Henrique pelo amor e pelos ensinamentos diários.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Evolução histórica da cerveja no Brasil	19
Referências	23
2 ENVELHECIMENTO DE CERVEJA EM BARRIS DE MADEIRA E SEUS ASPECTOS QUÍMICOS.....	25
Resumo	25
Abstract	25
2.1 Introdução	26
2.1.1 Material e Métodos	32
2.1.2 Análises físico-químicas	36
2.1.3 Grau alcoólico	37
2.1.4 pH.....	37
2.1.5 Acidez total titulável.....	37
2.1.6 Turbidez	37
2.1.7 Cor.....	38
2.1.8 Compostos fenólicos totais.....	38
2.1.9 Amargor.....	39
2.1.10 Análise por cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE)	39
2.1.11 Análises de compostos voláteis por cromatografia gasosa – CG.....	40
2.1.12 Análise sensorial	40
2.1.13 Análise estatística	41
2.2 Resultados e Discussão	42
2.2.1 Alterações físico-químicas.....	42
2.2.2 Alteração químicas nos compostos voláteis.....	43
2.2.3 Cerveja flandres red ale envelhecida por 3 meses em barris de carvalho	49
2.2.4 Cerveja flandres red ale envelhecida por 5 meses em barris de carvalho	53
2.2.5 Análise Sensorial.....	56
2.2.6 Conclusões.....	60
Referências	61

3 INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM CERVEJAS ENVELHECIDAS EM BARRIS DE MADEIRA	67
Resumo	67
Abstract.....	67
3.1 Introdução.....	68
3.1.1 Flanders Red Ale	70
3.1.2 <i>Brettanomyces</i>	73
3.2 Material e Métodos	76
3.2.1 Análises físico-químicas	76
3.2.2. Análises microbiológicas.....	77
3.2.3 Meios de cultivo	77
3.2.4 Identificação de isolados de meio DBDM	78
3.2.5 Análises estatísticas	79
3.3 Resultados e Discussão	80
3.3.1 Variáveis físico-químicas	80
3.3.2 Variáveis de compostos voláteis.....	81
3.3.3 Variáveis de congêneres de maturação.....	83
3.3.4 Variáveis microbiológicas	84
3.3.5 Conclusões	86
Referências.....	87
APÊNDICES	91

RESUMO

Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos

Nas últimas décadas, houve um aumento do consumo de cerveja no Brasil e no resto do mundo. Existem diversos conceitos e metodologias que diferenciam os estilos de cerveja, sejam nas modificações dos processos de produção, uso de diferentes ingredientes, fermentações em fermentadores de diferentes tipos, metodologias de envase, utilização de madeira na maturação da bebida, entre outros. Paralelamente à evolução dos conhecimentos científicos em Microbiologia, tais como, o crescente entendimento da fisiologia celular, as técnicas de imobilização da levedura cervejeira e o isolamento de novas estirpes que fornecem características aromáticas diferenciadas às cervejas. O armazenamento de bebidas em barris de madeira é amplamente utilizado desde a antiguidade na produção de bebidas, seja na forma de armazenamento e no aumento da complexidade do produto. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a formação de alguns compostos aromáticos durante o envelhecimento de cerveja tipo *Flanders Red Ale* em barris de madeira, levando em consideração aspectos químicos e microbiológicos tais como: congêneres de maturação analisando os conteúdos de compostos fenólicos de baixo peso molecular determinados por cromatografia líquida de alto desempenho, congêneres voláteis (aldeídos, ésteres e álcoois superiores) determinadas por cromatografia em fase gasosa e as propriedades microbiológicas da cerveja como viabilidade celular, meios de cultivo diferenciados para isolamento de levedura totais, bactérias ácidos acéticas, bactérias lácticas e meio modificado para isolamento de *Brettanomyces*. O estudo foi realizado nas dependências da microcervejaria do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba (SP). A fermentação primária do mosto cervejeiro foi conduzida à 23°C em fermentador cilíndrico cônico de inox, após refrigeração a 0°C por duas semanas a cerveja foi armazenada em barris (50 litros) de carvalho americano à 25°C por três e cinco meses. Após a maturação, uma cerveja nova (*Young Ale*) foi produzida e misturada (*Blend*) com a cerveja envelhecida em diferentes proporções: cerveja *Young Ale*; *blends* com 33% e 66% de cerveja envelhecida; 100% cerveja envelhecida, após os *Blends*, as cervejas foram engarrafadas e armazenadas por um período de três meses para início das análises químicas, microbiológicas e sensoriais. Ocorreram alterações químicas e microbiológicas que favoreceram o aumento da complexidade da cerveja após passar por um período de armazenamento em barril de carvalho, sendo que, essa alteração foi maior proporcionalmente ao aumento do tempo de armazenamento da cerveja.

Palavras-chave: Cerveja Ale; Envelhecimento; Barril de carvalho; Microrganismos; Análises químicas

ABSTRACT

Aged beer in wooden barrels, chemical and microbiological aspects

In recent decades, there has been an increase in beer consumption in Brazil and around the world. There are many methodologies and concepts that differentiate styles of beer, are the modifications of the production processes, use of various ingredients fermentations in fermenters of different types of packaging methodologies, wood use in beverage maturation, among others. Parallel to the development of scientific knowledge in microbiology, such as the growing understanding of cellular physiology, the immobilization techniques of brewing yeast and isolation of new strains that provide aromatic characteristics differentiated the beers. The storage of drinks in wooden barrels is widely used since antiquity in the production of drinks. The objective of this research was to evaluate the formation of some aromatic compounds at Ale type beer aging in wooden barrels, taking into account chemical and microbiological aspects such as: maturation of similar analyzing the content of phenolic compounds of low molecular weight determined by chromatography high performance liquid volatile counterparts (aldehydes, esters and higher alcohols) determined by gas chromatography using a flame ionization detector and microbiological properties of beer analyzing cell viability, different culture media for total yeast, bacteria acetic acid, Lactic acid bacteria and growth medium modified to *Brettanomyces*. The study was conducted in the microbrewery premises of the agribusiness department, food and nutrition Luiz de Queiroz College of Agriculture, Piracicaba (SP). The primary fermentation was conducted at 23° C in tapered cylindrical stainless steel fermenter after cooling to 0° beer was stored in barrels (50 liters) American oak at 25° C for three and five months. After maturation, a new beer (Young Ale) was produced and blended (blend) with the aged beer bottled and stored for analysis. After maturation, a new beer (Young Ale) was produced and mixed (Blend) with the beer aged in different proportions : Young beer Ale ; blends of 33 % and 66 % of aged beer; 100 % aged beer, the beers were bottled and stored for a period of three months to the beginning of the chemical, microbiological and sensory analysis. Microbial and chemical changes occurred that favored increased complexity of the beer after passing through a storage period in oak barrel, and that changes was greater in proportion to the increase beer storage time.

Keywords: Ale beer; Aging; Oak barrel; Microorganisms; Chemical analyses

1 INTRODUÇÃO

A legislação brasileira para cervejas segue o Decreto nº 6.871, de junho de 2009, e regulamenta pela lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, descreve o que é cerveja. Dessa forma, define-se atualmente cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2015). Segundo Almeida e Silva (2005) cerveja é uma bebida não destilada, com baixo teor alcoólico 3,5 a 6,5 % dependendo do tipo de cerveja, cujas matérias-primas, essenciais para sua produção, são diretamente responsáveis pelas características sensoriais do produto. Essas matérias-primas são representadas por: água de boa qualidade; malte, cujo cereal mais utilizado é a cevada; lúpulo, que dá o amargor característico à cerveja; fermento ou levedura cervejeira, que propiciará a fermentação do mosto cervejeiro (ALMEIDA e SILVA, 2005). No entanto, é importante ressaltar que a bebida ainda contará com gás carbônico e etanol, oriundos da fermentação, vários sais inorgânicos e mais de setenta compostos orgânicos diversos (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA; SILVA, 2006).

Por meio de diferentes combinações de matérias-primas, alterando as variedades e as quantidades desses componentes, somados com o tempo e a forma de preparo diferenciado, podem-se obter estilos variados de cerveja (TSCHOPE, 2001).

A água, não diferente dos demais componentes, é um dos principais fatores a ser levado em consideração na produção de cervejas, pois é indispensável a todas as reações químicas e bioquímicas da fermentação. É a principal matéria prima, em termos de qualidade, visto que compõe de 92 a 95% do volume da cerveja (ALMEIDA; SILVA, 2005; REINOLD, 2007). Segundo Jackson (2007), a água que irá compor a cerveja tem que ser tratada química e fisicamente, assegurando assim a qualidade da mesma. Tschope (2001) cita que a água deve conter as seguintes características: teor máximo de ferro (0,1ppm), teor máximo de manganês (0,1 ppm), dureza total, teor máximo de carbonato de cálcio (100 ppm) e demanda química de oxigênio (DQO) máxima de 2,0 ppm. A indústria cervejeira utiliza água proveniente de captações municipais ou poços artesianos, sendo sua composição química adaptada para atender às exigências de cada local e adequada para o consumo humano. O pH da água influencia a produção de diferentes estilos de cerveja,

devendo ser mantido entre 4,5 a 5,8 (TSCHOPE, 2001). Desta forma, a água usada na cervejaria deve ser insípida e inodora para não interferir nas propriedades organolépticas do produto (CRUZ, 2007).

Ao se manter o valor de pH nesta faixa, garante-se que as enzimas do malte sejam ativadas e atuem sobre o amido de forma a transformarem os açúcares fermentáveis. É também nesta faixa de pH que ocorrem as extrações ótimas das moléculas amargas e aromáticas do lúpulo, bem como uma boa coagulação do material mucilaginoso (*trub*) após a fervura (KUNZE, 1999).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta que se desenvolve tipicamente entre os paralelos de latitude 35 e 55°, em regiões frias dos Estados Unidos, Alemanha, República Tcheca, Polônia, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China, Chile e Argentina (TSCHOPE, 2001). Pertence à família *Cannabaceae* e é uma planta dióica, apresentando flores masculinas e femininas em indivíduos diferentes, não havendo, portanto, planta hermafrodita (ALMEIDA; SILVA, 2005). No entanto, para sua aplicação ao processo cervejeiro usam-se apenas as flores femininas não fecundadas. É uma planta de difícil cultivo por ser rica em umidade (80%) e, portanto, suscetível ao ataque de parasitas (TSCHOPE, 2001), mas por serem perenes são propagadas vegetativamente (SEIDL, 2003). O lúpulo, além de aroma e amargor, também tem propriedades anti-microbianas, pois os ácidos isoalfa são bacteriostáticos (ALMEIDA; SILVA, 2005).

As flores femininas do lúpulo contêm a lupulina – pó glandular produzido nas brácteas e bractéolas da flor – que é responsável por conferir o amargor e o aroma característicos da cerveja (ALMEIDA; SILVA, 2005). O lúpulo apresenta óleos essenciais (0,3%), β -ácidos ou lupulonas (1,5 – 9,5%) e α -ácidos ou humulonas (2,0 – 16,0%), mas as proporções de cada composto dependem da variedade da planta (SILVA; FARIA, 2008). Os óleos essenciais da planta, que conferem à cerveja o aroma típico do lúpulo, são muito voláteis - 96 a 98% são perdidos durante a fervura do mosto - e a pequena quantidade que permanece dissolvida ainda sofrerá uma pequena oxidação que dará o caráter aromático à cerveja (TSCHOPE, 2001).

Os β -ácidos do lúpulo possuem ação bacteriostática e bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana e alterando o pH intracelular. A pronunciada ação sobre bactérias Gram-positivas parece estar relacionada à interferência do grupo prenil, presente nas cadeias laterais dos β -ácidos, sobre a membrana

plasmática das células bacterianas, inibindo fortemente o seu crescimento (SILVA; FARIA, 2008).

A quantidade de amargor depende da concentração de alfa-ácidos insolúveis que são isomerizados durante a fervura do mosto, gerando os compostos iso-alfa-ácidos que são muito mais amargos e muito mais solúveis. Dependendo da cerveja a ser produzida, com mais ou com menos amargor, a adição do lúpulo interfere diretamente na bebida. O lúpulo de amargor é adicionado no início da fervura do mosto e a isomerização somente acontece ao ponto de ebulição. No entanto, o lúpulo aromático geralmente é adicionado no final da fervura do mosto, onde os óleos essenciais se volatilizam facilmente (KUNZE, 1999).

O lúpulo é comercializado *in natura* (flores secas), na forma de pellets desidratados ou como extrato, podendo ser classificado conforme suas características químicas (Tabela1) predominantes em lúpulos aromáticos ou de amargor.

Tabela1 - Composição química do lúpulo em flor

Características	Percentagem (%)
Resinas amargas	12,0 - 22,0
Proteínas	13,0 - 18,0
Celulose	10,0 - 17,0
Polifenóis	4 - 14,0
Umidade	10,0 - 12,0
Sais minerais	7 - 10,0
Açúcares	2 - 4,0
Lipídios	2,5 - 3,0
Óleos essenciais	0,5 - 2,0
Aminoácidos	0,1 - 0,2

Fonte: Tschope (2001)

O grão utilizado em cervejarias é obtido a partir de variedades de cevada maltada para uso em produção de cerveja. É uma gramínea do gênero *Hordeum*, parente do trigo, e seu cultivo ocorre principalmente em climas temperados. No Brasil é produzida em algumas regiões do Rio Grande do Sul durante o inverno e comercializada juntamente com outros maltes provenientes da Europa. Na América do Sul a Argentina é a grande produtora de cevada maltada (CARVALHO, 2006).

A cevada possui mais de 32 espécies, além dos híbridos ou transgênicos. São encontrados dois tipos de variações na espécie, uma de duas e outra de seis fileiras em cada espiga (Figura 1).

Figura 1 - Diferença entre cevada de duas e seis fileiras
Fonte: Oliver (2009)

A cevada de duas fileiras possui grãos maiores e mais uniformes ao ser comparado com a de seis fileiras, pelo fato de conter elevada concentração de extrato, constituído principalmente por amido. Dependendo do tipo de cerveja a ser produzido, o cervejeiro pode escolher entre as duas variedades de cevada de acordo com a necessidade do processo (BRIGGS, 2004; REINOLD, 1997).

A cevada é submetida a um processo de germinação controlada (maltagem), promovendo alterações físicas e químicas no grão. Fisicamente, ocorre a formação de radículas e da acrospira (precursora da primeira folha) e, quimicamente, ocorre a formação das enzimas (α -amilase, β -amilase, dextrinase, endo-peptidase, exo-peptidase e hemicelulose) que irão agir sobre o amido e as proteínas no ponto adequado durante a fase de mosturação (TSCHOPE, 2001). A germinação pode ser conduzida em diversas intensidades, durante cinco ou seis dias, produzindo assim diferentes tipos de malte, como o tipo pilsen, caramelo, chocolate, entre outros. A temperatura dos grãos e sua oxigenação também são controladas durante a germinação (CRUZ, 2007).

Os maltes podem ser classificados como maltes de base ou especiais, os quais se diferenciam pela quantidade representativa do total utilizado e os efeitos que proporcionam no produto final. Os maltes de base são assim denominados porque proporção é maior em relação aos especiais, proporcionam à cerveja maior

concentração de extrato açucarado, além de fornecer grande parte do poder enzimático. Já os maltes especiais, atribuem características mais particulares que proporcionam ou atenuam suas propriedades, como a presença de proteínas de médio peso molecular que beneficiam a estabilidade da espuma, ou até mesmo a cor e o sabor. A quantidade de uso deste tipo de malte é considerada bem inferior em relação ao malte-base. Contudo, para determinado tipo de cerveja a ser produzida, o cervejeiro pode utilizar de um a dois tipos, ou dependendo do que é desejado, empregar até oito diferentes tipos de malte especiais (REINOLD, 2007).

A utilização de leveduras (Figura 3) pelo homem na produção de alimentos ocorre já há milhares de anos em processos fermentativos espontâneos que abrigavam distintos microrganismos do ambiente, incluindo leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Alguns povos primitivos de regiões da Ásia, África e América Latina, por exemplo, já fabricavam uma espécie de mingau com diversos cereais, bagas, raízes e sementes misturadas, que posteriormente era fermentado pelas bactérias e leveduras do meio, promovendo uma bebida parecida com a cerveja (DRAGONE; ALMEIDA; SILVA, 2010).

Figura 2 - Microfotografia de levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Chateaufneuf (2008)

A descoberta das leveduras, no entanto, ocorreu no final do século XIX, por Louis Pasteur, que realizou estudos específicos sobre a atuação fermentativa das leveduras em cerveja e vinho. Além disso, foi nesta época que se elucidou a rota da via metabólica da glicólise, sendo fundamental para compreensão do processo

fermentativo (JACKSON, 2007; VARNAM, 1997). O conhecimento das propriedades funcionais e suplementares de certa levedura, é fundamental, juntamente com a matéria-prima e processos técnicos adequados, para a produção de determinado tipo de cerveja. Para saber qual fermento é mais adequado para tal processo analisa-se, entre outros parâmetros, a característica de floculação da levedura, ou seja, o comportamento em suspensão dos flocos formados após a fermentação. Também é necessário observar se as leveduras estão se reproduzindo durante a fermentação, aumentando seu peso de 3 a 5 vezes (BAMFORTH, 2005; VENTURINI, 2005; CEREDA, 1985).

Para a transformação dos açúcares disponíveis no mosto, em produtos que determinará o sabor e aroma, como o álcool e o gás carbônico, são utilizadas leveduras do gênero *Saccharomyces*. As cepas responsáveis por esse processo são as *S. pasteurianus (carlsbergensis)* tipo lager e a *S. cerevisiae* tipo ale, que são utilizadas nas duas grandes famílias de cervejas, com diferentes tipos de fermentação, delimitando-as como tal. A baixa fermentação (Figura 4) é feita pela *S. uvarum*, a temperaturas entre 7 e 15° C e por até 10 dias; estas leveduras tipicamente se sedimentam no fundo do tanque após a fermentação tumultuosa, e dão origem às cervejas do tipo Lager. São responsáveis por reduzir o pH do mosto para aproximadamente 3,8. A cerveja tipo Ale é obtida pela alta fermentação, com cepas de *S. cerevisiae*, que floculam e acumulam-se na superfície do tanque durante a fermentação tumultuosa, sendo que esse tipo de processo ocorre de 18 a 25° C e por um período de 3 a 5 dias, observando-se redução do pH a 4,1 (JAY, 2005; TSCHOPE, 2001; VARNAM, 1997).

A diferença metabólica que permite separar as cepas lager e ale é a capacidade de a primeira poder fermentar a melibiose, por possuir a enzima α -galactosidase ou melibiase, que transforma a melibiose em glicose e galactose. Esse dissacarídeo, que foi transformado, junto com a frutose, forma o trissacarídeo rafinose. Sendo assim, a levedura *S. uvarum* consegue metabolizar integralmente a rafinose, já a levedura *S. cerevisiae*, que não contém a melibiase, só alcança a fermentação de um terço da rafinose, pois somente a frutose é metabolizável. Além do tipo de açúcar que determinada levedura poderá utilizar, averigua-se a quantia de oxigênio que cada um necessita para poder crescer e os tipos e quantidades de metabólitos formados após a fermentação (BAMFORTH, 2005; KUNZE, 1999; REINOLD, 1997; VENTURINI, 2005).

Figura 3 - Processamento dos dois principais tipos de cervejas

Fonte: Russel (1995)

1.1 Evolução histórica da cerveja no Brasil

Estima-se que o homem começou a utilizar bebidas fermentadas há mil anos. Estudos indicam que a produção da cerveja teve início por volta de 800 a.C. Esta bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais. Na antiguidade, difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada, entre os povos da Suméria, Babilônicos, Egípcios, bem como, gregos e romanos durante o apogeu destas civilizações (MORADO, 2009).

Dentre os povos bárbaros que ocuparam a Europa durante o Império Romano, os de origem germânica destacaram-se na arte de fabricar a cerveja, sendo os primeiros a empregar o lúpulo na cerveja, conferindo as características básicas da bebida atual. Com a revolução Industrial, o modo de produção e distribuição sofreu mudanças decisivas, estabelecendo-se então, fábricas cada vez maiores na Inglaterra, Alemanha e no Império Austro-Húngaro (MORADO, 2008).

A cerveja chegou ao Brasil em 1808, trazida pela família real portuguesa de mudança para o então Brasil colônia. Com a abertura dos portos às nações amigas de Portugal, a Inglaterra foi a primeira a introduzir a cerveja na antiga colônia (CERVESIA, 2015).

A legislação vigente define como cerveja como sendo a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto, oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo. Parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos (arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo, todos integrais, em flocos ou na sua parte amilácea) e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não (BRASIL, 2015)

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, o Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de produção da bebida, com mais de 10,34 bilhões de litros por ano, perdendo apenas, em volume, para a China (35 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano) e Alemanha (10,7 bilhões de litros/ano) (CARVALHO, 2006).

Nas últimas décadas, com o aumento do consumo de cerveja em todo o mundo, tem se observado uma significativa evolução dos conhecimentos científicos neste universo, tais como o melhor entendimento da fisiologia celular, as técnicas de imobilização da levedura cervejeira, fermentação e maturação em sistemas contínuos e obtenção de novas linhagens de leveduras. Tudo isto vem beneficiando o avanço e controle do processo cervejeiro.

Nos últimos anos observa-se a expansão de microcervejarias no Brasil, produzindo cervejas diferenciadas e de alta qualidade que, pouco a pouco, vêm conquistando o paladar do consumidor. Diferentemente das cervejas comumente comercializadas, as cervejas artesanais costumam ser mais elaboradas e exploram uma diversidade de sabores e aromas que atendem a um número crescente de consumidores cada vez mais exigentes e seletivos. A atual concorrência do setor cervejeiro tem levado a uma dinamização de produtos diferenciados que, além de

mais rentáveis, vêm atender a um forte mercado em expansão, apresentando forte crescimento em comparação com as cervejarias convencionais (ESPERANCINI, 2011). As cervejas especiais têm ganhado cada vez mais popularidade, sendo que em 2008 movimentaram 409 milhões de reais e em 2009 esse valor foi sete vezes superior. Essas cervejas diferenciadas representam hoje 5% dos dez bilhões de litros vendidos por ano no país (SINDSERV, 2014).

Atualmente estima-se que haja mais de 300 cervejarias no Brasil, sendo 200 delas são classificadas como microcervejarias, com produtos diferenciados que atendem a um número crescente de consumidores cada vez mais exigentes. As cervejas especiais, sejam elas artesanais, importadas ou industriais de categoria *premium*, representam atualmente 1,5% do mercado, com estimativas de duplicação desse percentual nos próximos cinco anos (MORADO, 2009). Isso denota o grande fortalecimento do setor e a necessidade de inovações e melhorias no processo.

As cervejas tipo *gourmet* vêm ganhando mercado em nosso país por ser um produto com características sensoriais mais complexas, normalmente utilizando exclusivamente malte de cevada na sua formulação. Estes produtos apresentam aromas e sabores diferenciados, com qualidade superior quando comparados às cervejas populares que utilizam em sua formulação adjuntos (matérias primas que substituem a cevada maltada), visando diminuição de custos e aumento da produtividade.

Entre as novas cervejas especiais disponíveis no mercado brasileiro estão algumas envelhecidas em madeira, como o carvalho a exemplo dos estilos *Wood and Barrel Aged Beer* – cervejas envelhecidas em barril de madeira e as *European Sour Ale*. São cervejas Ale ácidas que, além da influência da madeira, permitem a interação com outros microrganismos como bactérias lácticas, acéticas e em muitos casos leveduras do gênero *Brettanomyces* (BREWERS ASSOCIATION, 2015)

Cervejas especiais envelhecidas em barris de carvalho são produzidas originalmente por cervejarias belgas, que as armazenam por até dois anos para incrementar sabores e aromas, aumentando a qualidade da bebida (SCHOLTES et al., 2012). Maccari-Júnior (2012) citou a introdução das cervejas amadeiradas no mercado brasileiro, principalmente utilizando o carvalho para maturação. Contudo, na literatura, não se encontram dados que revelem detalhadamente a interação entre a cerveja e a madeira ao longo do envelhecimento.

A madeira do carvalho (*Quercus spp.*) sempre foi muito utilizada pelo homem, seja na construção civil, na construção de barcos, na confecção de barris para fermentar, armazenar, transportar e amadurecer vinho, uísque, rum e outras bebidas alcoólicas. Os barris de madeira, antes de serem substituídos pelos tanques metálicos, eram os recipientes usados na fermentação, maturação e armazenamento da cerveja. Segundo Oliver (2012) as cervejas maturadas em barris que já foram utilizados na maturação de outras bebidas incorporam algumas notas de sabores da bebida anteriormente armazenada. Por outro lado, inúmeras reações ocorrem pelo contato da bebida com a madeira, incluindo a extração de compostos como ácidos fenólicos e aldeídos, oxidação e esterificação da lignina, responsáveis por notas aromáticas, sabor e cor (BOSCOLO et al., 1995).

Frente à expansão no setor cervejeiro, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou uma consulta pública em 2014 reunindo representantes do setor cervejeiro com o propósito de revisar as exigências legais para se produzir cerveja no Brasil. Dentre os assuntos abordados nesta reunião, discutiu-se sobre a manutenção da cevada como ingrediente obrigatório e/ou a alteração de seu limite de utilização, a possibilidade de utilizar como ingredientes produtos de origem animal (tais como leite e mel) e a possibilidade e os parâmetros de envelhecimento de cerveja em madeiras, além da possível utilização de frutas, ervas, vegetais e flores (BRASIL, 2013).

Objetivo geral

Avaliar as alterações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de uma cerveja estilo *Flanders Red Ale*, envelhecida em barris de carvalho por três e cinco meses.

Objetivos específicos

1) Produzir uma cerveja com os parâmetros de uma cerveja do estilo *Flanders Red Ale* envelhecida em barril de carvalho e estudar possíveis interações de microrganismos presentes na madeira.

- 2) Misturas (*Blends*): buscar uma melhor harmonização de componentes aromáticos entre as diferentes misturas de cervejas envelhecidas e não envelhecidas em contato com a madeira.
- 3) Avaliar sensorialmente os componentes aromáticos e os congêneres voláteis em cada *blend*.
- 4) Avaliar os principais grupos microbianos ativos e sua influência sobre a cerveja.

Referências

ALMEIDA E SILVA, J.B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G. W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgar Blucher, 2005. p. 347-380.

BAMFORTH, C.W. **Food, fermentation and microorganisms**. Wiley: Blackwell Science, 2005. 230 p.

BOSCOLO, M.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. O envelhecimento de aguardente de cana-de-açúcar em tonéis de madeira. **O Engarrafador Moderno**. São Caetano do Sul, v. 41, n. 1, p. 30-33, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**: regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, 1997. p. 19.556. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 10 jul. 2015.

_____. **Consulta pública**: portaria DAS/MAPA 30/2013. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.buriti.df.gov.br/ftp/diariooficial/2013/05_Maio/DODF>. Acesso em: 23 jul. 2015.

BREWERSASSICIATION. **Beerstyleguidelines**. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/attachments/0000/7526/2012_BA_Beer_Styles_Final.pdf> /Acesso: em: 10 maio 2015.

BRIGGS, D.E.; BROOKES, P.A.; STEVENS, R.; BOULTON, C.A. **Brewing**: science and practice. Cambridge: Woodhead Publ., 2004. 848 p.

CARVALHO, G.B.M.D.; BENTO, C.V.; SILVA, J.B.D.A.E. Elementos biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro. Parte 1: as leveduras. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 36-32, out./nov. 2006.

CEREDA, M.P. Cervejas, In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Biotechnologia**: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blucher, 1985. v. 5, p. 44-78.

CRUZ, J.M.M. Cerveja. In: FONSECA, M.M.; TEIXEIRA, J.A. **Reactores biológicas**. Lisboa; Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

- DRAGONE, G.; SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v. 1, p. 15-50.
- ESPERANCINE, M.S.T. Mercado brasileiro de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Indústria de bebidas: inovação, gestão e produção**. São Paulo: Edgard Blucher, 2011. v. 3, cap. 14, p. 293-322.
- JACKSON, M. **Cerveja**. 2. ed. Rio de Janeiro: Zahar, 2007. 250 p.
- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 230 p.
- KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlin: VLB Berlin, 1999. 726 p.
- MACCARI-JUNIOR, A. A invasão das amadeiradas. **Revista da Cerveja**, São Paulo, n. 4, p. 70-73, 2012.
- MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 357 p.
- OLIVER, G. **The Oxford companion to beer**. New York: Oxford University Press, 2012. 936 p.
- REINOLD, M.R. O mercado cervejeiro brasileiro atual: potencial de crescimento. **Indústria de Bebidas**, Santo André, v. 10, n. 57, p. 28-29, 2011.
- RUSSEL, I.; STEWART, G.G. Brewing. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise; enzymes, biomass, food and feed**. Weinheim: VCH, 1995. p. 419-462.
- SCHOLTES, C; NIZET, S; COLLIN, S. Occurrence of sotolon, abhexon and theaspirane-derived molecules in Gueuze beers. Chemical similarities with 'yellow wines'. **Journal of the Institute of Brewing**. V.118. p. 223–229, 2012.
- SEIDL, C. **O catecismo da cerveja**. São Paulo: Editor SENAC, 2003. 385 p.
- SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 902-906, out./dez. 2008.
- TSCHOPE, E.C. **Microcervejarias e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia**. São Paulo: Aden, 2001. 223 p.
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Bebidas: tecnologia, química e microbiologia**. Zaragoza: Acribia, 1997. 487 p.
- VENTURINI, W.G.F. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 223 p.

2 ENVELHECIMENTO DE CERVEJA EM BARRIS DE MADEIRA E SEUS ASPECTOS QUÍMICOS

Resumo

O envelhecimento de bebidas em madeira é uma prática importante, muito utilizada na obtenção de bebidas de alta qualidade. O objetivo deste estudo foi quantificar os congêneres de maturação de uma cerveja do estilo *Flanders Red Ale*, sendo envelhecida por 90 e 120 dias em barris de carvalho de 50L a 25°C. Após a maturação, uma cerveja nova do mesmo estilo denominada *Young Ale* foi produzida e misturada (Blend) com a cerveja envelhecida, estabelecendo-se 4 produtos diferentes: 100% *Young Ale* (amostra 1); 33% de cerveja envelhecida (amostra 2), 66% envelhecida (amostra 3) e 100% envelhecida (amostra 4). As amostras foram engarrafadas e armazenadas durante três meses. Após o período de maturação, cada produto foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, considerando-se os seguintes compostos de envelhecimento: ácido gálico, ácido vanílico e ácido síringico, vanilina, siringaldeído, sinapaldeído, coniferaldeído, furfural, 5-hidroximetilfurfural. Avaliaram-se também algumas alterações físico-químicas, o perfil de compostos voláteis (CG), assim como o perfil sensorial. Pôde-se constatar que a concentração de compostos derivados da madeira foi diretamente proporcional à quantidade de cerveja envelhecida nas respectivas amostras. As análises mostraram um aumento de todos os congêneres de maturação: a amostra 4 apresentou concentrações duas vezes superior de ácido gálico (6,57 mg/L), vanilina (0,68 mg/L) e coniferaldeído (0,62 mg/L), quando comparada com a cerveja *Young Ale* (amostra 1). Para os parâmetros de 5-HMF, sinapaldeído, furfural, ácido síringico, ácido vanílico e siringaldeído, a cerveja envelhecida (4) apresentou concentrações três vezes superior em relação à cerveja não envelhecida (1). Os resultados mostram que o envelhecimento em barris de madeira afetam diretamente o conteúdo de compostos aromáticos e voláteis das cervejas e que o aumento do tempo de envelhecimento, aumenta também os atributos sensoriais da bebida.

Palavras-chave: Barris de carvalho; Envelhecimento; Cerveja; Análises físico-químicas

Abstract

Beverage maturation in wood is an important practice that is widely used in the production of high-quality beverages. The aim of this study was quantify the maturation congeners of *Flanders Red Ale* beer aged for 90 days in new oak barrels of 50L which was stored at 25°C. After maturation, a *Young Ale* was produced and blended with the aged one, as follows: 1 (100% *Young Ale*); 2 (33% aged), 3 (66% aged) e 4 (100% aged). The samples were bottled and stored for three months. The contents of ageing marker compounds were determined by high-performance liquid chromatography: gallic acid, vanillic acid and syringic acid, vanillin, syringaldehyde, sinapaldehyde, coniferaldehyde, furfural, 5-hydroxymethylfurfural. The contents of wood-derived compounds increased their concentration during the aged beer and were proportional to the blends applied. The analyses showed an increase of all maturation congeners. Compared to sample 1, sample 4 doubled the concentrations

of gallic acid (3.59 to 6.57 mg/L), vanillin (0.32 to 0.68 mg/L) and coniferaldehyde (0.33 to 0.62 mg/L). For 5-HMF, sinapaldehyde, furfural, syringic acid, vanillic acid and siringaldehyde aged beer (4) tripled their concentrations compared to Young Ale (1). The results show that aging beer in wood barrels directly affect the content of aromatic and volatile compounds and increasing the aging time also increases the sensory attributes of the beverage.

Keywords: ak barrels; geing compounds; Aged beer; Physico-chemical analysis

2.1 Introdução

A tradição de maturação da cerveja em madeira começou na Bélgica, há cerca de 200 anos. Em Flandres, região norte da Bélgica, os pequenos fazendeiros produtores de cervejas confeccionavam a bebida e as armazenavam em barris de madeira para ganharem características peculiares de sabores e aromas. Essas cervejas eram feitas com altas quantidades de lúpulo para minimizar os riscos de contaminação, visto que o lúpulo também apresenta atividade antimicrobiana (MARKOWSKI, 2004). A tradição diz que o envelhecimento da cerveja era realizado em grandes caldeirões antigos de carvalho sem tampa. A madeira é o lar de dezenas de leveduras selvagens, que estimulam a fermentação de açúcares residuais, produzindo cerveja com sabores azedos muito particulares e interessantes (JACKSON, 2007).

Os tanques de madeira eram usados para fermentar e maturar cervejas sem a intenção de que o produto final adquirisse suas características, e por isso recebiam um tratamento interno de resina para minimizar ou inibir a interação com a madeira. Na década de 1990, o crescimento das microcervejarias nos Estados Unidos, a utilização de madeira para maturação reapareceu, dessa vez com a intenção de que a cerveja incorporasse compostos da madeira e/ou da bebida que fora armazenada no barril anteriormente, como vinho, conhaque, uísque ou rum. Atualmente, muitas cervejarias utilizam barris de madeira para fermentar e maturar a cerveja, especialmente na Bélgica, Inglaterra e Estados Unidos. No Brasil essa técnica é recente, tendo começado a ganhar projeção nos últimos cinco anos. O período de maturação pode variar de semanas a anos, dependendo do tipo de cerveja e do resultado que se quer obter. O fabricante da Bamberg St. Michael produz uma cerveja estilo Weizenbock Dunkel maturada por seis meses em barris de carvalho. Na Bélgica, os estilos Lambic, Oud Bruin e Flanders Red Ale são maturados durante

dois ou três anos nos barris de madeira. Na Inglaterra, Estados Unidos e Itália há algumas microcervejarias utilizando barris de madeira anteriormente empregados no envelhecimento de vinho, uísque e outras bebidas (CILURZO, 2015).

Normalmente a cerveja passa por um longo período de maturação nesses barris e depois é misturada a uma cerveja jovem para suavizar um pouco a acidez adquirida ao longo do processo. Do ponto de vista físico-químico, a maturação no barril de madeira se diferencia por permitir inúmeras reações que não acontecem em materiais inertes como o aço inox, amplamente utilizado devido à facilidade de limpeza e sanitização. Enquanto este é impermeável e não reage com o líquido, a madeira libera substâncias que interagem continuamente com a bebida contida. Os cascos porosos permitem a entrada de ar, proporcionando uma micro-oxigenação e levando a uma lenta oxidação. Por outro lado, existe também a possibilidade de que microrganismos instalados nas paredes internas possam também realizar um processo de fermentação secundária durante esse contato (KUNZE, 1999; BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM, 2015).

Segundo Maccari-Júnior (2012), durante a maturação ocorrem trocas onde os compostos químicos da madeira passam para a cerveja e vice-versa, ressaltando-se que essas substâncias possuem aroma e sabor específicos. Como cada madeira tem uma composição diferente, transfere itens para a cerveja, gerando novas percepções sensoriais. O período de maturação pode variar de três meses a cinco anos e o tempo para adquirir as características é influenciado por inúmeros fatores, como o tipo de madeira, histórico do barril e tamanho do recipiente. Ao mesmo tempo, deve-se considerar a graduação alcoólica, concentração de sólidos solúveis e a quantidade de lúpulo, sem esquecer-se da influência do ambiente externo, que afetarão diretamente o resultado do produto.

Barris remanufaturados que contiveram outras bebidas, como vinho, uísque, rum e cachaça, exigem tratamento prévio com um líquido de teor alcoólico elevado ou lupulagem alta para suportar a contaminação natural ocorrida no processo. Desse modo, durante o contato com a madeira, a contaminação será o resultado da ação de microrganismos naturalmente instalados, incluindo leveduras selvagens e bactérias, principalmente bactérias ácido lácticas (BAMFORTH, 2005; KUNZE, 1996).

Pelas leis americanas, o uísque Bourbon verdadeiro deve ser envelhecido por um período mínimo de pelo menos dois anos em barricas novas de carvalho branco

americano, isso significa que um barril só pode ser usado uma vez para a bebida receber a denominação de legitimidade, fato que transforma esse material em item excedente para a destilaria, mas com um diferencial, ao invés de novas, as barricas já haviam acondicionado outras bebidas (OLIVER, 2012).

O carvalho possui características de elevado potencial aromático, marcadas principalmente por aromas de baunilha e outras especiarias como a canela, a pimenta e o alcaçuz (SCHNEIDER, 2005). O tostado interno dos barris imprime os aromas de torrefação como café, chocolate, caramelo e pão tostado (BORGES, 2009). Os barris produzidos com carvalho (*Quercus* spp.), além de permitirem uma eficiente armazenagem de líquidos, também melhoram sensivelmente a qualidade organolética da bebida. Os barris confeccionados com essa madeira são usados para a maturação de diversas bebidas alcoólicas, incluindo o uísque, conhaque, cachaça e vinho (ALCARDE, SOUZA, BELLUCO, 2010; DIAS, MAIA, NELSON, 1998; MOSEDALE, 1994; NISHIMURA, MATSUYAMA, 1989).

A madeira do carvalho é uma árvore do gênero *Quercus*, da família Fagaceae, desenvolvendo-se majoritariamente nas zonas temperadas do hemisfério norte e sendo representado por mais de 250 espécies (NIXON, 2006). A composição da madeira é responsável pelas características sensoriais da interação com a bebida. Cada espécie tem suas propriedades específicas, dependendo da sua composição. Os principais carvalhos empregados para essa função são os de origem europeia e norte-americana devidos às suas características químicas e estruturais. Os principais constituintes químicos presentes nos diferentes tipos de carvalho estão indicados na Tabela 1 e incluem a celulose, hemicelulose e lignina, além de taninos e pequenas quantidades de lipídios (óleos, gorduras e ceras) (PETTERSEN, 1984).

Tabela 1 - Composição dos carvalhos Europeus e Norte Americanos

	celulose	hemicelulose	lignina	extrativos	cinzas
Carvalho Europeu	38-52	22	25-31	4,4	0,3
<i>Quercus rubor</i> ¹	39-42	19-26	25-34	3,8-6,1	0,3
<i>Quercus petraea</i> ²	22-50	17-30	17-30	0,2-10	0,2
<i>Quercus alba</i> ³	44	24	24	5,4	1
<i>Quercus alba</i> ⁴	42	28	25	5,3	0,2
<i>Quercus prinus</i>	41	30	22	6,6	0,4

Valores expressos em (mg/L). ¹ Carvalho inglês, difundido em toda a Europa. ² Carvalho séssil. ³ Carvalho branco americano do pantanoso terreno na Geórgia. ⁴ Carvalho branco americano do planalto seco no Tennessee.

Fonte: Pettersen (1984).

Os compostos da madeira, quando colocados em contato com a bebida, são responsáveis por fornecer características aromáticas e de sabores diferenciadas devido às transformações químicas ocorridas entre os dois. Esses compostos presentes em pequenas quantidades têm um papel importante no envelhecimento de bebidas, pois são extraídos diretamente pelo contato da madeira com a bebida alcoólica (AMARANTE, 2005). O esquema representado na Figura 1 mostra qual parte da madeira do carvalho influencia no envelhecimento de diferentes bebidas alcoólicas.

Figura 1 - Influência de cada parte do carvalho sobre a maturação de bebida alcoólica
Fonte: Adaptado de Thomson (1996)

O mecanismo de maturação de bebidas alcoólicas baseia-se nas trocas entre os compostos da madeira e a bebida, sendo que a degradação dos constituintes da madeira somadas aos compostos formados durante a fermentação definirão as características sensoriais da bebida. O perfil aromático depende de diversos fatores, principalmente a espécie vegetal empregada. Outros fatores estão relacionados com as práticas realizadas pelas tanoarias (corte da madeira, maturação e tratamento térmico interno), tempo de envelhecimento e condições de armazenamento que também influenciarão a qualidade química do produto (CONNER; REID; JACK, 2003).

A hemicelulose comparada com a celulose é menos abundante, porém quando a madeira sofre o tratamento térmico ela se quebra em açúcares de baixo peso molecular como glicose, xilose, manose, arabinose e galactose, dando origem a produtos de degradação que conferem à bebida notas caramelizadas (BARRICHELO; BRITO, 1980; GONZAGA, 2006). As diferentes intensidades de tostadura interna dos barris de carvalho são de fundamental importância para a formação de compostos que podem originar o 5-hidroximetil-furfural (5-HMF) (Figura 2).

Figura 2 - Produção de compostos aromáticos através da quebra da Hemicelulose do carvalho por tratamento térmico
Fonte: Adaptado de Nishimura (1989)

Esses compostos conferem descritores a tostado, caramelo, pão e amêndoa, além de outras substâncias que conferem uma coloração marrom característica (NISHIMURA, 1989; SINGLETON, 1995; PARAZZI, 2008).

Durante a quebra da hemicelulose em função do tratamento térmico da madeira, geram-se subprodutos que conferirão descritores tostados à bebida, não podendo-se deixar de mencionar outros compostos também formados nesse processo, como o ácido acético, álcool metílico (CARDOSO, 2006) e 5-hidroximetilfurfural (NISHIMURA, 1989).

A lignina é um componente da madeira que preenche os espaços das fibras de celulose e tem a capacidade de tornar a parede celular rígida e impermeável. É um composto aromático de alto peso molecular e tem como base estrutural unidades de fenil-propano. Após o tratamento térmico (120 a 180°C), formam-se duas estruturas de blocos a partir da lignina, comumente designados congêneres de maturação, sendo que alguns aldeídos fenólicos derivam da lignina, especialmente a vanilina. Outros compostos que podem ser formados incluem o grupo guaiacol, composto por

coniferaldeído, vanilina e ácido vanílico, e o grupo siringol, composto por sinapaldeído, siringaldeído e ácido sirínico (Figura 3) (MASSON et al., 1995). A vanilina é um dos principais compostos formados nesse processo e confere notas aromáticas a tostado (SINGLETON, 1995).

Figura 3 - Estrutura de blocos Guaiacol (A) e Siringol (B) a partir da lignina de carvalho

Fonte: Nykanen (1986)

Outra substância encontrada no carvalho com tratamento térmico são as lactonas. Esses isômeros são divididos em cis e trans-lactonas (Figura 4). As cis-lactonas são encontradas em maiores quantidades do que as trans-lactonas e influenciam todas as bebidas que passam por envelhecimento em madeira de carvalho (PUECH, 1995). Esses dois compostos são originados a partir de quantidades pequenas de lipídeos, óleos, gorduras e ceras contidos na madeira, podendo aumentar suas quantidades em função da espécie e do grau de tostadura empregado. Geralmente ambos isômeros podem ser identificados pelas notas de aroma de coco e madeira fresca, sendo que a cis-lactona apresenta caráter aromático mais intenso e a de maior contribuição sensorial (AMARANTE, 2005).

Figura 4 - Lactonas de carvalho

Fonte: Puech (1995)

Tabela 2 - Compostos de aroma derivados da madeira do carvalho

Hemicelulose	5-Hidroximetil Furfural	Taninos	Vescalagin
	Furfural		Castalagin
	Acido Acetico		Ácido elágico
	Xilose		Acido Galico
	Glicose		
	Arabinose	Lipídios	Cis-oak-lactone
	Rhamnose		Trans-oak-lactone
	Frutose		
Lignina	Vanilina	Camada de carvão	
	Siringaldeido		Fenol
	Coniferaldeido		Guaicol
	Acido Vanilico		Etil guaiacol
	Sinapaldeido		p-cresol
	Acido Siringico		Eugenol

Fonte: Adaptado de Gunther e Mosand (1986)

Segundo os guias de estilos *Beer Judge Certification Program* (2015) e do *Brewers Association* (2015), o processo de envelhecimento da cerveja em madeira (Wood-Aged Beer) é um método tradicional, raramente usado por grandes cervejarias e aplicado à produção de cervejas especiais ou sazonais. O emprego de barris de carvalho é o método mais tradicional, embora outras madeiras têm se tornando também populares para essa finalidade.

2.1.1 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo.

Distribuição do experimento

Foram produzidos 200L de cerveja em duas etapas de mosturação, cada uma com capacidade de 100L. Para cada mosturação utilizaram-se 25 Kg de malte tipo *Pilsen* (Agrária, Guarapuava), 1kg tipo *Cararoma*[®] e 2kg tipo *CaraRed*[®] (Weiermann, Bamberg). Para a etapa de lupulagem do mosto utilizaram-se os lúpulos *Hallertau Nugget* 10% (teor de alfa ácidos 30g/100L) e *Saaz* 4,8% (teor de alfa ácidos 50 g/100L). Também aplicou-se clarificante de mosto ao processo (Wirflfloc, 5g/100L).

Após a moagem dos grãos, a mosturação foi realizada por infusão com aquecimentos sucessivos de 50°C/ 10min; 67°C/ 40min, 70°C/ 10min e 78°C/ 5min. A temperatura durante a mosturação foi elevada na razão de 1°C/ min.

Após inativação das enzimas a 78°C, a mistura foi transferida para o tanque de filtração-clarificação, realizando-se a separação do mosto e dos resíduos sólidos (bagaço) com duas lavagens com água (78°C). O mosto obtido foi transferido para o tanque de fervura, aquecido até ponto de ebulição por 60 min. Nesta etapa adicionaram-se os lúpulos de amargor (Nugget) e aromático (Saaz) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema resumido do processo de produção, da moagem ao envase
 Fonte: Adaptado de Wyler (2014)

Após a fermentação primária a cerveja foi dividida em dois barris de carvalho (V = 50L) previamente lavados com água à 98°C por 4 horas. Após o acondicionamento da cerveja, os barris foram armazenados a 23°C (com oscilação de ± 2 °C), respectivamente durante três e cinco meses (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representando a etapa de maturação da cerveja controle

Após o período de maturação, respectivamente de três e cinco meses, as cervejas envelhecidas foram mescladas com uma cerveja *Young Ale* recém produzida com a mesma receita daquela submetida ao envelhecimento (Figura 6).

Figura 6 - Foto dos barris de carvalho (50/litros cada) utilizados para maturação da cerveja
Fonte: arquivo pessoal

A Figura 7 representa as mesclas (*blends*) realizadas para a obtenção dos produtos finais a serem engarrafados, utilizando-se cerveja maturada durante três e cinco meses nas seguintes proporções: não envelhecida (*Young Ale*), 33% envelhecida, 66% envelhecida e 100% envelhecida. Para carbonatação das cervejas engarrafadas, foi utilizado o processo de re-fermentação, onde se adiciona uma quantidade extra de açúcar (5gr/L de cerveja) para carbonatação em cada garrafa.

Figura 7 - Esquema do *Blends* (mistura) das cervejas maturadas em barris de carvalho com cerveja nova (*Young Ale*)

2.1.2 Análises físico-químicas

As amostras de cervejas foram coletadas no início, final do terceiro e quinto mês de armazenamento (envelhecimento em barris). Após a coleta das amostras, as mesmas foram descarbonatadas e submetidas às análises de teor alcoólico, pH, acidez, turbidez, cor, fenólicos totais, amargor, cromatografia gasosa, líquida e microbiologia.

2.1.3 Grau alcoólico

O grau alcoólico foi determinado em um densímetro digital DMA 4500 (Anton Paar). As amostras foram previamente destiladas em micro-destilador (TECNAL, modelo TE012), de acordo com a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005).

2.1.4 pH

O pH foi determinado em pHmetro digital (DMPH-1 Digimed, Tecnal), por imersão direta do eletrodo na amostra descarbonatada.

2.1.5 Acidez total titulável

A determinação da acidez total analisada, expressa em gramas de ácido sulfúrico por litro de amostra, foi obtida por titulometria de neutralização. Segundo a equação:

$$\text{Ac. Total} = \frac{Vg \times F \times N \times 49}{V}$$

Onde: A= acidez total (g de H₂SO₄/L);

Vg= volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

F= fator de correção da concentração da solução de hidróxido de sódio;

N= normalidade da solução de 0,1 NaOH;

49= equivalente do ácido sulfúrico;

v= volume da amostra (20mL).

2.1.6 Turbidez

A turbidez das amostras foi analisada em turbidímetro digital (2100P, Hach), sendo os valores estipulados em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

2.1.7 Cor

A intensidade da cor foi medida utilizando-se o método 8.5 espectrofotométrico Analytica – EBC (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2000). A amostra de cerveja foi filtrada em membrana 0,45 μm e, a seguir, foi realizada a leitura da absorbância a 430nm, utilizando cubeta de 10mm. O cálculo da cor da amostra não diluída foi realizada pela fórmula:

$$\text{Cor (EBC)} = A \cdot f \cdot 25$$

Onde: A= absorbância a 430nm em cubetas de 10mm

f= fator de diluição

2.1.8 Compostos fenólicos totais

Para essa determinação foi utilizado o método espectrofotométrico desenvolvido por Folin-Ciocalteu (AMERINE; OUGH, 1980). A absorbância foi medida a 765nm e os resultados expressos em mg GAE/100 mL⁻¹ (equivalente de ácido gálico por amostra). Os resultados foram calculados pela fórmula obtida na curva padrão $y = 0,1197x + 0,00023$ com $r^2 = 0,9924$ (Figura 8).

Figura 8 - Curva padrão do ácido gálico

2.1.9 Amargor

O amargor foi determinado pelo método 9.8 Analytica – EBC (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2004), após extração por iso-octano (2,2,4 – trimetilpentano) em amostras acidificadas, seguido de medição espectrofotométrica em comprimento de onda de 275nm, sendo a resposta obtida em BU (Bitterness Units). Segundo a equação:

$$\text{Amargor (EBU)} = \text{Abs } 275\text{nm} \times 50.$$

2.1.10 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As cervejas foram analisadas quanto à concentração de alguns compostos característicos da interação com a madeira, incluindo taninos (ácidos gálico), aldeídos (siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e vanilina), ácidos (vanílico, siríngico), 5-hidroximetilfurfural e furfural.

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10AD, com duas bombas Shimadzu LC-20AD, detector UV-Visível Shimadzu SPD-20A com sistema *dual* para detecção no ultravioleta a 280 e 313 nm, processador de dados CBM-20A, sistema de injeção automático de 20 µL, fluxo de 1,1mL/min com sistema gradiente de eluição. A fase móvel A foi: água MiliQ e ácido acético 98:2 (v/v); a fase móvel B: metanol, água MiliQ e ácido acético 70:28:2 (v/v). Coluna de fase reversa C-18, modelo Shim-pack CLC-ODS, 4,6 mm, 25 cm x 5 µm e pré-coluna G-ODS, 4,0mm x 1 cm (Shimadzu). Coluna termostatzada a 40°C. O comprimento de onda foi variável durante a análise.

Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção e/ou pela adição de solução padrão na amostra; a quantificação foi realizada diretamente por meio da curva-padrão.

Padrões Cromatográficos: ácido gálico, 5-HMF, furfural, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e cumarina (Sigma-Aldrich-St. Louis, USA). Todos com grau de pureza superior a 99%.

Solventes: Metanol (cromatográfico); ácido acético, água ultrapura purificada em sistema Mili-Q (Millipore). Filtração da Fase Móvel com membrana de ultrafiltração 0,45µm.

Amostras e padrões: foram filtradas em sistema a vácuo de líquidos (Millipore Manifold) com membrana de nylon (abertura de 0,45 μm), ambos com 0,13 cm de diâmetro.

As amostras de cerveja foram previamente desgaseificadas por ultrassom durante 30 minutos, filtradas em filtro 0,45 μm e transferidas para o tubo *vail* para análise.

2.1.11 Análises de compostos voláteis por cromatografia gasosa

A concentração dos seguintes compostos voláteis foi determinada por cromatografia gasosa: aldeídos, ésteres, metanol alcoóis, álcool isobutílico, álcool isoamílico e álcool n-propílico. Todas as análises foram realizadas em um cromatógrafo CG-037, equipado com coluna empacotada PAAC 3334-CG e detector de ionização de chama (FID). Como gás de arraste utilizou-se H_2 , com vazão de 30 mL/min. O padrão interno utilizado no equipamento é o 4-metil-2-pentanol. A temperatura do injetor foi programada para 170°C. A programação da temperatura da coluna isotérmica foi de 94°C e a temperatura do detector programada para 225°C.

2.1.12 Análise sensorial

A Análise sensorial é usada para evocar (provocar), medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais como são percebidos pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 1994).

A avaliação sensorial dos produtos obtidos foi realizada nas dependências da empresa: Cervejaria The Bridge Brewery, localizada na cidade de Piracicaba – SP, CNPJ 18.519.099/0001-06.

As amostras foram submetidas a um comitê treinado de sete degustadores experientes que descreveram as percepções a partir de pontos de vista qualitativos e quantitativos. A análise sensorial foi realizada conforme os parâmetros e procedimentos estabelecidos pela norma de padrão internacional ISO 11035 (1994) (PORTUGAL; PALACIOS, 2012), conforme apresentado a seguir:

a) Busca e seleção de descritores – Três amostras representativas do conjunto foram selecionadas para a seleção de descritores elaborando uma lista de termos descritivos, sem descuidar de nenhum aspecto do produto. Concebeu-se o máximo de termos que descrevessem todas as sensações originadas. Eliminaram-se consensualmente os termos genéricos, redundantes e hedônicos até que todos fossem facilmente compreensíveis. Estimou-se a intensidade dos descritores em uma escala de 0 (ausência de percepção) a 5 (intensidade muito alta). Reagruparam-se os termos sinônimos e eliminaram-se aqueles que pudessem contribuir muito pouco ao objetivo de evidenciar as diferenças entre os produtos e elaborou-se uma ficha de degustação como resultado do processo para a avaliação total das amostras.

b) Análise dos dados – Calculou-se a média aritmética para cada descritor e realizou-se a análise de componentes principais (ACP) utilizando o programa Statgraphics Centurion para os seguintes conjuntos: fases visual, olfativa, gustativa e retronasal.

A análise foi realizada segundo os parâmetros estipulados pela norma ISO-11035 (ABNT, 1994), com a elaboração de um formulário de descritores (Apêndice A) e posteriormente a elaboração da lista de Análise Descritiva para cerveja envelhecida em barris de madeira.

2.1.13 Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas, compostos voláteis e congêneres de maturação foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Já para a análise sensorial os resultados foram submetidos à análise de componentes principais (ACP), onde este procedimento executa uma análise de componentes principais, com o objectivo da obtenção de um pequeno número de combinações lineares de variáveis que explicam a maior variabilidade dos dados. 95,7203% da variabilidade nos dados originais.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa Statgraphics Centurion XVI (versão 16.1.02, 32-bits, autorizados pela Stat Point Technologies, Inc. 1982-2010).

2.2 Resultados e Discussão

A cerveja do estilo *Flanders Red Ale* foi produzida e envelhecida em barris de carvalho por 3 e 5 meses, após cada período de maturação as cervejas foram engarrafadas e analisadas quanto às alterações físico-químicas, alterações de compostos voláteis e análise sensorial comparando com a cerveja não envelhecida.

2.2.1 Alterações físico-químicas

As análises das variáveis físico-químicas (gradação alcoólica, pH, acidez total, cor, compostos fenólicos, amargor, turbidez) revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras não envelhecidas (testemunhas) e as amostras envelhecidas por três e cinco meses (Figura 3).

Tabela 3 - Comparação das análises físico-químicas de cervejas ao longo do tempo de envelhecimento em barris de carvalho

Parâmetros	testemunha	Envelhecidas	
		3 mês	5 mês
Grau alcoólico real (v/v%)	4,94 ^c	5,93 ^b	6,23 ^a
Turbidez (NTU)	18,21 ^a	13,05 ^b	12,89 ^b
pH	4,87 ^a	4,43 ^b	4,23 ^c
Acidez total (gH₂SO₄/L)	1,14 ^c	1,50 ^b	1,61 ^a
Fenólicos totais (mg/L)	102,88 ^b	128,20 ^a	128,98 ^a
Cor (EBC)	28,66 ^b	33,75 ^a	34,15 ^a
Amargor (EBU)	15,98 ^a	12,38 ^b	11,92 ^c

Test.(Testemunha): sem envelhecimento/armazenamento nos barris de carvalho. Letras diferentes para cada variável indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Em comparação com a cerveja que não teve contato com a madeira, as amostras de três e cinco meses apresentaram aumento no grau alcoólico, acidez, compostos fenólicos e cor. Segundo Oliver (2012), relata que esta metodologia de envelhecimentos de cerveja em barris de madeira alguns compostos têm seus valores modificados, aumentando ou diminuindo dependendo do tempo de armazenamento e da intensidade das reações químicas ocorridas entre a bebida e a madeira.

A turbidez tende a diminuir durante o armazenamento da cerveja, pois as partículas em suspensão decantam por formarem compostos químicos de peso molecular mais alto. Desse modo, a precipitação das partículas em suspensão

tornam a bebida mais límpida pelo contato com a madeira, sendo que essa diminuição tende a ser proporcional ao tempo de armazenamento.

Quanto aos valores de pH, averiguaram-se diminuições dos valores comparados entre a testemunha e as amostras envelhecidas, essa diminuição do valor de pH aumenta com o passar do tempo de envelhecimento, justificadas por reações químicas ocorridas entre a cerveja e a madeira. Os dados aqui encontrados são compatíveis com a faixa citada por Oliver (2012), que relata que cervejas tipo *ale* apresentam valores de pH em torno de 3,5 a 5,0. Wyler (2014), que estudou o envelhecimento de cerveja tipo *Lager* em barris de carvalho também relata valores similares nesse sentido.

2.2.2 Alteração químicas nos compostos voláteis

A composição de moléculas voláteis encontradas em cervejas está suscetível a alterações durante o processo de envelhecimento em barris de madeira (SPARROW, 2005). Neste estudo pode-se observar um aumento na concentração de ésteres, metanol, ácido acético e álcool Iso-amílico quando comparamos as testemunhas (*Young Ales*) com as amostras envelhecidas por três e cinco meses (Tabela 4). Segundo Nykanen (1986) os compostos químicos em maiores concentrações encontrados em cervejas *Flanders Red Ale* são ácido acético, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e acetato de etila. A concentração desses compostos na cerveja é diretamente proporcional ao tempo de envelhecimento, de modo que quanto mais tempo em contato com a madeira mais elevadas suas concentrações.

Tabela 4 - Comparação dos compostos voláteis ao longo do tempo de envelhecimento em barris de carvalho

Parâmetros	testemunha	Envelhecidas	
		3 mês	5 mês
Aldeídos acético	17,7 ^b	20,8 ^a	0,1 ^c
Acetato de etila	46,7 ^b	46,7 ^b	104,8 ^a
Metanol	2,0 ^b	2,9 ^b	7,9 ^a
Propanol*	47,1 ^a	43,5 ^a	46,2 ^a
Iso-butanol*	22,6 ^c	32,4 ^b	46,1 ^a
Iso-amílico*	95,7 ^c	104,7 ^b	134,8 ^a
Ác. Acético	64,1 ^c	173,8 ^b	290,6 ^a
álc. Superiores	165,4 ^c	180,7 ^b	227,1 ^a

* (álcoois superiores totais)

Amostras analisadas em mg/L de amostra.

Test. (Testemunha): sem envelhecimento/armazenamento nos barris de carvalho.

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

As concentrações de alguns compostos voláteis formados durante a fermentação de mosto cervejeiro estão descritas na Tabela 5, com os respectivos limites de detecção.

Tabela 5 - Compostos formados durante a fermentação de mosto cervejeiro e seus limites de detecção em cerveja e as taxas encontradas em cervejas, vinhos e whiskey

Compostos/Flavor	Limiar de percepção em cerveja (mg/L)	Taxas em cerveja (mg/L)	Taxas em vinhos (mg/L)	Taxas em whiskey (mg/L)
Acetato de etila	20 - 40	10 - 50	<150	100 - 200
Hexanoato de atila	0,15 - 0,25	0,07 - 0,5	0,3 - 1,2	-----
Acetato isoamil	1 - 2	0,5 - 5	0,1 - 4	2,5
Propanol	800	10 - 100	10 - 70	-----
Álcool isoamílico	70	30 - 150	6 - 490	200
Acetaldeído	10 - 20	2 - 20	5 - 100	2 - 3
Ácido acético	60 - 120	30 - 300	-----	30 - 50
Etanol (%)	1,5 - 2 %	3 - 8 %	5 - 15 %	30 - 60 %

Fonte: Meilgaard (1975) e Saison et al. (2008)

O acetaldeído é o principal aldeído presente na cerveja e sua formação está relacionada com a reação de oxidação do etanol. Esses compostos têm grande relevância aromática em bebidas fermentadas, como indicado na Tabela 6, mas apresentam um limiar de percepção relativamente baixo e não devem exceder certas concentrações (TRUGO; DE MARIA, 2000; MAIA, 1994).

Tabela 6 – Descritores aromáticos/sensoriais dos compostos formados durante a fermentação alcoólica de mosto cervejeiro

Compostos formados na fermentação	Sabores ou aromas
Acetato de etila	solvente, frutado
Álcoois superiores	dor de cabeça
Acetato isoamila	banana, pera
Acetaldeído	maçã verde
Diacetil	manteiga
Dimetil sulfeto DMS	vegetal, milho cozido
Fenóis	pimenta, medicinal, alho

Fonte: Adaptado de White (2010)

O perfil comparativo dos compostos voláteis (Figura 9) mostra a evolução e a interação com os respectivos subprodutos, sendo esta interação, proporcional ao aumento do tempo de envelhecimento na formação de ésteres, ácido acético e álcoois superiores.

Figura 9 - Perfil comparativo dos compostos voláteis ao longo do tempo: (0) não envelhecida, (3) 100% envelhecida 3 meses, (5) 100% envelhecida 5 meses

■ aldeídos, ■ ésteres, ■ ácido acético, ■ álcoois superiores

Durante o envelhecimento de bebidas alcoólicas em contato com a madeira, os compostos fenólicos podem estar suscetíveis à oxidação e consequente formação de subprodutos (Figura 10). A oxidação do coniferaldeído origina a vanilina, que ainda pode ser oxidada a ácido vanílico e, consequentemente, a etil vanilato. No caso do sinapaldeído, é oxidado a siringaldeído, e este último também é oxidado e forma o ácido sirínico, que por sua vez pode dar origem ao etil siringato (NISHIMURA et. al., 2003 apud NISHIMURA; MATSUY, 1989).

Figura 10 - Conversão de compostos fenólicos de baixo peso molecular e ésteres a partir da lignina da madeira durante o armazenamento de uma solução de 60% de etanol (NISHIMURA et. al.)

A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados para os compostos que representam os congêneres de maturação. Encontraram-se diferenças relevantes entre as amostras não envelhecidas (testemunhas) e as amostras envelhecidas por três e cinco meses, evidenciando que os perfis de compostos de maturação são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Comparação dos congêneres de maturação ao longo do tempo de envelhecimento em barris de carvalho

Congêneres de maturação	testemunha	Envelhecidas	
		3 mês	5 mês
Ac. Gálico	3,59 ^c	6,57 ^b	17,6 ^a
5-HMF	0,45 ^b	1,44 ^a	0,62 ^b
Furfural	0,44 ^c	3,31 ^a	1,18 ^b
Coniferaldeído	0,33 ^b	0,62 ^a	0,64 ^a
Vanillina	0,32 ^c	0,68 ^b	2,97 ^a
Ác. vanílico	0,68 ^c	1,01 ^b	4,82 ^a
Sinapaldeído	0,34 ^c	1,00 ^a	0,69 ^b
Siringaldeído	1,02 ^c	3,88 ^a	1,79 ^b
Ác. Siringico	0,15 ^c	1,27 ^b	4,51 ^a

Amostras analisadas em mg/L de amostra

Test. (Testemunha): sem envelhecimento/armazenamento nos barris de carvalho.

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

A cerveja apresenta em sua composição muitos ácidos fenólicos, incluindo alguns compostos característicos do processo de maturação de bebidas alcoólicas em barris de carvalho. O perfil comparativo dos congêneres de maturação encontra-se representado na Figura 11, evidenciando diferenças significativas para o teor de ácido gálico entre as amostras não envelhecidas e aquelas maturadas por três e cinco meses. O resultado obtido ao final do quinto mês de envelhecimento (17,6 mg/L) mostram uma evolução deste composto, aumentando seu valor em comparação com a cerveja não envelhecida (3,59 mg/L), esse aumento indica que as concentrações desse composto são diretamente proporcionais ao tempo de contato da bebida com a madeira. Pode-se observar que a madeira influenciou aumento desse congêner ao longo do tempo de envelhecimento. Resultado semelhante, 17,18 mg/L, obtido por Wyler (2014) onde trabalhou com cerveja tipo lager envelhecida com cubos de carvalho à 0°C por três meses.

Figura 11 - Perfil comparativo dos congêneres de maturação ao longo do tempo: (0) não envelhecida, (3) 100% envelhecida 3 meses, (5) 100% envelhecida 5 meses

■ ácido gálico, ■ 5-HMF, ■ furfural

O coniferaldeído é um composto oriundo da degradação térmica da lignina e que pode ser oxidado a vanilina e conseqüentemente a ácido vanílico. As amostras analisadas apresentadas na (Figura 12) mostram um perfil comparativo dos congêneres de maturação (coniferaldeído, vanilina e ácido vanílico) de cerveja não envelhecida e cervejas que passaram por um determinado tempo de envelhecimento em barris de carvalho. Ficando evidente a evolução e a interação da bebida em contato com a madeira. O período de envelhecimento influenciou a formação desses

compostos principalmente nas amostras do quinto mês de envelhecimento. O aumento nos valores de vanilina (0,32 para 2,97mg/L) é justificado pela oxidação do coniferaldeído à vanilina por isso a baixa concentração ao final do quinto mês e a possível oxidação da vanilina à ácido vanílico. A vanilina pode ser encontrada em cerveja em concentrações muito pequenas variando de 0,01 mg/L (COLLIN, 2009) até 1,6mg/L (ACHILLI; CELLERINO; GAMACHE, 1993). Wyler (2014) obteve resultados que variaram de 0,25mg/L à 1,5mg/L em cervejas tipo lager envelhecidas em barris e/ou cubos de carvalho.

Figura 12 - Perfil comparativo dos congêneres de maturação ao longo do tempo: (0) não envelhecida, (3) 100% envelhecida 3 meses, (5) 100% envelhecida 5 meses

■ coniferaldeído, ■ vanilina, ■ ácido vanílico

O congênere de maturação sinapaldeído, também é um composto oriundo da degradação térmica da lignina, os resultados mostrados na (Figura 13) referentes aos congêneres de maturação (sinapaldeído, siringaldeído e ácido sirínico), evidenciam a formação de siringaldeído e ácido sirínico maior do que na amostra não envelhecida em barril de carvalho e que esta formação é influenciada pelo tempo de armazenamento da cerveja em contato com a madeira do carvalho.

Por tanto, o aumento do tempo de armazenamento da bebida em barris de carvalho influencia a formação dos compostos de maturação que seguem as reações químicas citadas na (Figura 10) onde ocorre uma oxidação dos aldeídos cinâmicos (sinapaldeído e coniferaldeído) com o aumento do tempo de envelhecimento, enquanto os aldeídos benzoicos (vanilina e siringaldeído) percebe-se um aumento desses compostos como citado por Nishimura et al. (2003) apud Nishimura e Matsuyama (1989).

Figura 13 - Perfil comparativo dos congêneres de maturação ao longo do tempo: (0) não envelhecida, (3) 100% envelhecida 3 meses, (5) 100% envelhecida 5 meses

■ sinapaldeído, ■ siringaldeído, ■ ácido siríngico

2.2.3 Cerveja *Flanders Red Ale* envelhecida por três meses em barris de carvalho

Como pode-se observar na Tabela 8, as análises físico-químicas de cerveja nova (*Young Ale*), cerveja envelhecida e *blends* revelaram um aumento de graduação alcoólica, compostos fenólicos e cor. Por outro lado, constatou-se uma diminuição significativa dos parâmetros de amargor, acidez total, pH e turbidez. No

caso dos *blends*, pôde-se comprovar que a porcentagem de cerveja envelhecida adicionada (33% e 66%) apresentaram correlação direta com a variação dos parâmetros considerados.

Tabela 8 - Comparação físico-químico de Young Ale e blends com cerveja envelhecida (3 meses)

Parâmetros	Young Ale	33%	66%	100%
Grau alcoólico % (v/v)	4,51 ^d	4,72 ^c	5,10 ^b	5,93 ^a
Turbidez (NTU)	94,60 ^a	79,87 ^b	79,40 ^b	65,27 ^c
pH	4,98 ^a	4,80 ^b	4,69 ^c	4,43 ^d
Acidez total (gH ₂ SO ₄ /L)	1,16 ^a	1,13 ^a	1,25 ^a	1,50 ^b
Fenólicos totais (mg/L)	101,7 ^c	116,9 ^b	123,3 ^a	128,2 ^a
Cor (EBC)	28,83 ^d	30,25 ^c	31,50 ^b	33,75 ^a
Amargor (EBU)	15,47 ^a	14,63 ^a	14,02 ^b	12,38 ^c

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU), European Brewery Convention (EBC), European Bitterness Units (EBU)

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa (P<0,05)

Os compostos que mais se destacaram na comparação de compostos voláteis (Tabela 9) foram os aldeídos, ácido acético e álcoois superiores. O acetaldeído é o principal aldeído presente na cerveja, esses compostos são de grande importância no aroma das bebidas, embora presentes em quantidades pequenas esses compostos conferem sabor de maçã verde a cerveja (WHITE, 2010; MAIA, 1994).

Algumas vias de formação do acetaldeídos estão relacionados durante o processamento da bebida, podendo ser durante o envelhecimento onde ocorre a degradação do amido pelas altas temperaturas e através do metabolismo de microrganismos (WALTERS, 1996). Os teores de acetaldeído em cervejas apresentam-se entre 2 a 20 mg/L (White, 2010), sendo os resultados obtidos ficando entre 17,9 mg/L na amostra 1 e 20,8 mg/L na amostra 4. Já as amostras 2 e 3 tiveram um aumento proporcional à quantidade de cerveja envelhecida nos Blends 33 e 66%.

Os ésteres desempenham um grande papel nas características das cervejas especialmente no estilo *A/e* (alta fermentação). O éster é um composto volátil formado a partir de um ácido orgânico e um álcool, proporcionando alguns aromas e sabores de frutas nas cervejas. Todas as cervejas contêm ésteres, algumas contêm cerca de 50 diferentes tipos de ésteres (MEILGAARD, 1975). Os ésteres são

quantificados pela quantidade de acetato de etila na cerveja, esta pode conter de 10 a 50 mg de acetato de etila por litro de amostra, já o vinho podemos encontrar mais de 150mg de acetato de etila por litro (WHITE, 2010). Os teores de ésteres mantiveram-se nos mesmos valores sem diferença estatística significativa entre as amostras. Porém os teores se encontram dentro da faixa encontrada em cervejas 10 a 50 mg/L (White, 2010).

A composição de álcoois superiores (propanol, 1-butanol e álcool isoamílico) pode variar em função do tipo da cerveja, mas tendem a conferir aromas com descritores a solvente na bebida (WHITE, 2010). A formação dos álcoois superiores está relacionada com a reoxidação do NADH a NAD^+ , de modo que a levedura produz esses compostos para viabilizar a disponibilidade de NAD^+ para reaproveitamento na via glicolítica (KRUGER, 1998). A produção de álcoois superiores é uma característica que pode variar de acordo com as linhagens de leveduras, sendo que leveduras de alta fermentação tendem a produzir maiores concentrações desses compostos do que linhagens de baixa fermentação. Nesse sentido, cabe a possibilidade de que a produção de elevadas concentrações de álcoois superiores esteja principalmente associada a temperaturas mais elevadas na condução do processo fermentativo (WHITE, 2010).

Meilgaard (1975), Saison et al. (2009) e Reed et al. (1991) citam em seus trabalhos a faixa de concentração a de álcoois superiores em cervejas tipo Ale, sendo para Propanol 10 a 100 mg/L, 1-butanol 1 a 150mg/L e álcool isoamílico 30 a 150mg/L. Os resultados obtidos no experimento de três meses de envelhecimento em madeira para os *blends* estão dentro das faixas citas pelos autores.

Também na (Tabela 9), está especificado os valores de ácido acético para todas as amostras de cervejas. O Ácido acético um ácido orgânico formado durante a fermentação alcoólica e sua produção pode variar de níveis em relação ao tipo de fermentação de cervejas (tipo Ale ou lager). Segundo Meilgaard (1975), Saison et al. (2009) e Reed et al. (1991) as faixas de ácido acético para cervejas variam de 30 a 200mg/L, obtivemos uma diferença significativa entre a cerveja 100% maturada em madeira 173,8 mg/L e a cerveja nova (Young Ale) 57,5 mg/L.

De fato, os *Blends* sofreram uma influência na composição físico-química por terem uma porcentagem de cerveja envelhecida nas amostras 2, 3 e 4.

Tabela 9 - Comparação de compostos voláteis de Young Ale e *blends* com cerveja envelhecida (3 meses)

Compostos químicos	Young Ale	33%	66%	100%
Aldeídos	17,9 ^c	19,0 ^b	19,9 ^{ab}	20,8 ^a
Esteres	45,2 ^a	46,7 ^a	45,4 ^a	46,7 ^a
Metanol	1,9 ^b	2,3 ^{ab}	2,6 ^{ab}	2,9 ^a
Propanol	43,8 ^a	45,5 ^a	46,0 ^a	43,5 ^a
Iso-butanol	21,1 ^c	25,1 ^b	28,9 ^a	32,4 ^a
I-butanol	0,3 ^a	0,3 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a
Álcool isoamílico	89,7 ^b	99,5 ^a	103,2 ^a	104,7 ^a
Ác. Acético	57,5 ^b	91,6 ^b	137,2 ^a	173,8 ^a
álc. Superiores	155,0 ^b	170,1 ^a	177,8 ^a	179,7 ^a

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Resultados expressos em mg/L

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

Os congêneres de maturação são compostos extraídos pela bebida durante o envelhecimento. Na comparação entre a cerveja nova (Young Ale) e os *blends* dos congêneres de maturação de cerveja envelhecida por três meses (Tabela 10), observamos um aumento dos teores destes compostos, sendo mais visível quando comparamos os níveis extremos entre as amostras 1 e 4.

Os aldeídos 5-HMF e Furfural estão relacionados com deterioração em cervejas comuns (não envelhecidas em madeiras). Esses compostos são formados a partir do tratamento interno (tosta) dos barris de madeira, pela degradação da celulose e hemicelulose, aumentando a concentração destes compostos em bebidas envelhecidas em barris de carvalho. Na comparação de 5-HMF para os três meses de envelhecimento houve diferença estatística entre a amostra 1 e os blends 2, 3 e 4 evidenciando um aumento deste composto conforme aumenta a porcentagem de cerveja envelhecido nos blends.

Os valores de sinapaldeído apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, sendo que a amostra 4 apresentou a maior concentração (1,0 mg/L). Quanto à concentração do siringaldeído, também pôde-se constatar uma relação diretamente proporcional à porcentagem de cerveja envelhecida, chegando a (3,88 mg/L) na amostra 4. O siringaldeído forma-se através da degradação da lignina durante o processo de tostadura interna dos barris de carvalho, mas vale salientar que também pode ser encontrado na composição de cervejas não envelhecidas (COLLIN, 2009) em concentrações discretas e inferiores a 0,01 mg/L.

Tabela 10 - Comparação de congêneres de maturação de Young Ale e *blends* com cerveja envelhecida (3 meses)

Congêneres de maturação	Young Ale	33%	66%	100%
Ac. gálico	3,76 ^b	4,13 ^b	6,17 ^a	6,57 ^a
5-HMF	0,43 ^c	0,82 ^b	0,99 ^b	1,44 ^a
Furfural	0,40 ^d	1,43 ^c	2,29 ^b	3,31 ^a
Ác. vanílico	0,73 ^b	0,85 ^{ab}	0,95 ^a	1,01 ^a
Ác. Siríngeo	0,14 ^b	0,44 ^b	0,54 ^b	1,27 ^a
Vanillina	0,36 ^b	0,41 ^b	0,57 ^a	0,68 ^a
Siringaldeído	1,00 ^d	2,13 ^c	3,18 ^b	3,88 ^a
Coniferaldeído	0,35 ^d	0,44 ^c	0,55 ^b	0,62 ^a
Sinapaldeído	0,33 ^d	0,46 ^c	0,55 ^b	1,00 ^a

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Resultados expressos em mg/L

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

2.2.4 Cerveja *Flanders Red Ale* envelhecida por cinco meses em barris de carvalho

Foram feitas análises físico-químicas (Tabela 11) das cervejas Young Ale, blends e cerveja 100% envelhecida por cinco meses em barris de carvalho. Um aumento significativo foi observado na graduação alcoólica (4,42v/v% amostra 1 para 6,23v/v% na amostra 4) um aumento de 29%, acidez total (1,12 à 1,61) aumento significativo estatisticamente, porém não muito notório. Os teores de compostos fenólicos e cor também houve um incremento significativo, onde comparando as amostras 1 e 4 os dois parâmetros houveram aumento de 21% nos

compostos fenólicos e 16% na cor, ambos os aumentos estão relacionados com o tempo de contato da bebida com a madeira. Por outro lado, ocorreu uma diminuição da turbidez mais evidente quando comparamos as amostras 1 e 4 (93,75 para 64,49 NTU) e uma diminuição um pouco menos notória nos parâmetros de pH e amargor justificado pelas interações entre a bebida e a madeira do carvalho.

Tabela 11 - Comparação físico-químico de Young Ale e *blends* com cerveja envelhecida (5 meses)

Compostos químicas	Young Ale	33%	66%	100%
Grau alcoólico (v/v%)	4,42 ^d	4,68 ^c	5,50 ^b	6,23 ^a
Turbidez (NTU)	93,75 ^a	78,34 ^b	78,15 ^c	64,49 ^d
pH	4,65 ^a	4,51 ^b	4,42 ^c	4,23 ^d
Acidez total (gH₂SO₄/L)	1,12 ^c	1,15 ^c	1,30 ^b	1,61 ^a
Fenólicos totais (mg/L)	101,89 ^d	118,34 ^c	126,54 ^b	128,98 ^a
Cor (EBC)	28,70 ^c	32,29 ^b	33,13 ^a	34,15 ^a
Amargor (EBU)	15,51 ^a	14,98 ^a	13,45 ^b	11,92 ^c

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU), European Brewery Convention (EBC), European Bitterness Units (EBU)

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa (P<0,05)

Quanto às análises de compostos voláteis (Tabela 12), houve um aumento significativo notório nas concentrações de ésteres comparados entre as amostras 1 e 4 (17,9 para 104,8 mg/L) aumento de 82%, sendo este aumento relacionado à degradação das estruturas da madeira, com isso auxiliando na formação deste composto. Metanol amostra 1 e 4 (0,1 para 7,9 mg/L) aumento de 98%, ácido acético amostras 1 e 4 (47,1 para 290,6 mg/L) aumento de 83% e álcoois superiores amostras 1 e 4 (157,1 para 227,1 mg/L) aumento de 30%, o incremento de ácido acético, metanol e álcoois superiores, podem estar relacionados pela interação entre a bebida e microrganismos habitantes da madeira que influenciaram o aumento destes compostos, o aumento destes parâmetros também é proporcional ao aumento das quantidades (%) de cerveja envelhecida nas amostras 2, 3 e 4.

Tabela 12 - Comparação de compostos voláteis de Young Ale e *blends* com cerveja envelhecida (5 meses)

Compostos voláteis	Young			
	Ale	33%	66%	100%
Aldeídos	1,8 ^a	0,1 ^b	0,1 ^b	0,1 ^b
Esteres	17,9 ^d	36,0 ^c	63,8 ^b	104,8 ^a
Metanol	0,1 ^c	3,8 ^b	4,3 ^b	7,9 ^a
Propanol	28,6 ^d	35,9 ^c	40,0 ^b	46,2 ^a
Iso-butanol	26,1 ^d	31,8 ^c	38,0 ^b	46,1 ^a
I-butanol	0,1 ^a	1,7 ^b	1,2 ^b	0,1 ^a
Álcool isoamílico	102,4 ^d	109,1 ^c	117,4 ^b	134,8 ^a
Ác. Acético	47,1 ^c	163,7 ^b	200,1 ^b	290,6 ^a
álc. Superiores	157,1 ^d	176,9 ^c	195,3 ^b	227,1 ^a

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Resultados expressos em mg/L

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa (P<0,05)

Na análise dos compostos de maturação (Tabela 13), verificou-se um aumento significativo nos teores de ácido gálico quando comparado entre as amostras 1 e 4 (3,79 para 17,6 mg/L) aumento de 78% justificado pelo tempo de contato da bebida com a madeira. Os teores de 5-HMF não tiveram diferenças estatísticas entre as amostras, ficando entorno de 0,56 a 0,62 mg/L nas amostras 1 e 4. Quanto aos aldeídos benzoicos (vanilina e siringaldeído), a vanilina apresentou aumento significativo entre os tratamentos quando comparado entre as amostras 1 e 4 (0,66 para 2,97mg/L), e os teores de siringaldeído, também quando comparamos entre as amostras 1 e 4 (1,80

para 1,79mg/L) observamos uma similaridade nos valores, ao passo que as amostras 2 e 3 (1,63 e 1,5mg/L) uma diferença significativamente estatística em relação às amostras 1 e 4.

Por outro lado, não se constataram diferenças estatísticas significativas nos teores dos aldeídos cinâmicos (sinapaldeído e coniferaldeído), entre as amostras com alguma porcentagem de cerveja envelhecida (amostras 2,3 e 4) os teores se mantiveram na faixa de 0,64 a 0,7mg/L. As amostras só se diferenciam quando comparadas com a amostra 1 em relação às amostras 2, 3 e 4.

Tabela 13 - Comparação dos congêneres de maturação de Young Ale e *blends* com cerveja envelhecida (5 meses)

Congêneres de maturação	Young Ale	33%	66%	100%
Ac. gálico	3,79 ^d	11,13 ^c	12,58 ^b	17,6 ^a
5-HMF	0,56 ^a	0,55 ^a	0,56 ^a	0,62 ^a
Furfural	0,51 ^a	2,16 ^b	1,18 ^c	1,18 ^c
Ác. vanílico	0,75 ^c	5,63 ^a	5,58 ^a	4,82 ^b
Ác. Siríngico	0,16 ^d	5,8 ^a	5,09 ^b	4,51 ^c
Vanillina	0,66 ^d	0,81 ^c	1,46 ^b	2,97 ^a
Siringaldeído	1,80 ^a	1,63 ^b	1,5 ^c	1,79 ^a
Coniferaldeído	0,52 ^b	0,69 ^a	0,66 ^a	0,64 ^a
Sinapaldeído	0,41 ^b	0,7 ^a	0,67 ^a	0,69 ^a

(1) Cerveja Young Ale; *blends* com 33% (2) e 66% (3) de cerveja envelhecida; (4) 100% cerveja envelhecida. Resultados expressos em mg/L

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa (P<0,05)

2.2.5 Análise Sensorial

Para a análise sensorial deste trabalho foi utilizada a normal ISO 11035 (ABNT, 1994), que tem a função da busca e seleção de descritores para a elaboração de perfis sensoriais de bebidas. Esta abordagem busca realizar aproximação multidimensional descrevendo as etapas para elaborar uma descrição completa no plano qualitativo (definindo descritores) e quantitativos (definindo intensidades de cada descritor). O método tem objetivo de estudar a influência dos processos aplicados na obtenção de um produto, neste caso, cerveja.

Seguindo a metodologia ISO 11035 selecionaram-se sete degustadores experientes que analisaram três amostras representativas às cegas. Nesta primeira

abordagem elaborou-se uma lista de descritores (APÊNDICE B) que contemplassem todas as sensações originadas nas fases visual, olfativa, gustativa e de retro-gosto. Foram analisadas amostras de cervejas tipo *Flanders Red Ale* que envelheceram em barris de carvalho por 3 e 5 meses com seus respectivos *blends*.

Aos valores obtidos submeteu-se a análise de componentes principais (ACP), onde se busca a importância relativa de cada eixo e a contribuição de cada descritor em relação aos eixos principais (contribuição relativa), bem como a qualidade de representação de cada elemento (projeção do espaço produto/descritor). As análises foram feitas para cada fase da análise sensorial (visual, olfativa, gustativa e retrogosto) individualmente.

Na Figura 14, observamos a análise de ACP para a fase visual da análise sensorial somente dos Blends envelhecidos em barris de madeira de carvalho por três e cinco meses, onde (14 A) nos mostra um agrupamento da amostra 1 e 4 direcionando para uma cor mais amarelada do que o outro agrupamento (14 B) onde se encontram as amostras 2, 3, 5 e 6, direcionando a fase visual desta análise mais para um tom âmbar e vermelho, o que é coerente com as amostras (blends) que tem uma porcentagem igual ou acima de 66% de cerveja envelhecida, justificando um aumento de cor devido a interação da bebida e a madeira durante o envelhecimento, valores ficando na faixa dentro do estilo de cerveja *Flanders Red Ale* (20 a 35 cor EBC).

Figura 14 - Análise de componentes principais, referente à fase visual da análise sensorial das cervejas (blends) envelhecidas em barris de madeira por 3 e 5 meses. Amostras envelhecidas por 3 meses: 1 (33% envelhecida), 2 (66% envelhecida) e 3 (100% envelhecida), amostras envelhecidas

por 5 meses: 4 (33% envelhecida), 5 (66% envelhecida) e 6 (100% envelhecida)

Os componentes principais (ACP) para a fase olfativa (Figura 15), foram analisados sensorialmente somente para os blends envelhecidos por três e cinco meses. Podemos inferir que nesta fase também ocorreu um agrupamento (15 A) das amostras 1 e 4 direcionando o olfato para aromas lembrando vinagre e fermento para estas amostras, o que permite afirmar que essas amostras com uma porcentagem de 33% de cerveja envelhecida seriam menos harmoniosas sensorialmente do que as outras amostras. Já o outro agrupamento (15 B) onde temos amostras com uma porcentagem maior de cerveja envelhecida 66% e 100% são as amostras que tiveram um direcionamento olfativo para caramelado, especiarias, torrefato, floral, fruta-passa e madeira onde podemos perceber uma maior harmonia olfativa e coerente com a proposta feita no trabalho.

Figura 15 - Análise de componentes principais, referente à fase olfativa da análise sensorial das cervejas (blends) envelhecidas em barris de madeira por 3 e 5 meses. Amostras envelhecidas por 3 meses: 1 (33% envelhecida), 2 (66% envelhecida) e 3 (100% envelhecida), amostras envelhecidas por 5 meses: 4 (33% envelhecida), 5 (66% envelhecida) e 6 (100% envelhecida)

Na fase gustativa (Figura 16) observamos uma maior dispersão entre as amostras. As amostras 1 e 4 com uma porcentagem de 33%, onde a amostra 1 direcionada para uma adstringência e álcool e para a amostra 4, um direcionamento

para paladar de fermento, ambas se mostrando não muito harmoniosas. As duas amostras se portam como uma cerveja ainda em fase de evolução, por tanto, ainda agressiva ao paladar e não harmoniosa. As amostras 2 e 3, têm um direcionamento para um paladar que remete a fruta-passa e lácteo, também demonstrando uma não harmonia durante a fase gustativa. A amostra 5 observamos um direcionamento gustativo remetendo à amargor, caramelado e levemente metálico. Já a amostra 6 mostra uma tendência direcionada para o paladar lembrando madeira, cítrico e especiarias, o que está diretamente relacionado com a proposta deste trabalho, onde buscou-se uma interação bebida-madeira, nuances amadeirados e uma harmonização entre o tempo de envelhecimento e a utilização blends na busca de um produto diferenciado e com qualidade sensorial.

Figura 16 - Análise de componentes principais, referente à fase gustativa da análise sensorial das cervejas (blends) envelhecidas em barris de madeira por 3 e 5 meses. Amostras envelhecidas por 3 meses: 1 (33% envelhecida), 2 (66% envelhecida) e 3 (100% envelhecida), amostras envelhecidas por 5 meses: 4 (33% envelhecida), 5 (66% envelhecida) e 6 (100% envelhecida)

A fase final, a de retrogosto (Figura 17), observamos um agrupamento das amostras 1 e 4 que se referem à porcentagem de 33% tanto para os três, quanto, para os cinco meses de envelhecimento, mostrando que essas amostras ainda estão ao que parece em fase de acabamento ou não muito harmonioza, ou seja, direcionando a cerveja para um retrogosto de fermento, geralmente relacionado com cervejas com defeitos sensoriais.

As amostras 5 e 6 (17 B) são as amostras de cervejas com uma porcentagem de 66 e 100% de cerveja envelhecida por cinco meses. Essas cervejas na fase de retrogosto da análise sensorial, nos mostra um direcionamento mais voltado para um retrogosto lembrando aromas lácteos, vinagre e especiarias.

Já as amostras 2 e 3 (17 A) que se referem às cervejas com 66 e 100% de cerveja envelhecida por três meses, podemos afirmar que para esta fase, o direcionamento aromático nos levou aos aromas lembrando terra e torrefato.

Figura 17 - Análise de componentes principais, referente à fase de retrogosto da análise sensorial das cervejas (blends) envelhecidas em barris de madeira por 3 e 5 meses. Amostras envelhecidas por 3 meses: 1 (33% envelhecida), 2 (66% envelhecida) e 3 (100% envelhecida), amostras envelhecidas por 5 meses: 4 (33% envelhecida), 5 (66% envelhecida) e 6 (100% envelhecida)

2.2.6 Conclusões

O uso de barris de carvalho como envelhecimento alterou a composição química e os congêneres de maturação da cerveja.

A análise dos parâmetros físico-químicos avaliados para as cervejas armazenadas em barris de carvalho sugere que houve variações suficientes que pudessem ser atribuídas ao tempo de envelhecimento da cerveja em contato com a madeira de carvalho, conclui-se também que as alterações ocorridas indicam que a cerveja sofreu modificações na qualidade sensorial, aumentando a qualidade do perfil sensorial.

A temperatura de armazenamento das cervejas em barris de carvalho (23°C $\pm$ 2) foi um fator que influenciou significativamente nas concentrações e perfis dos compostos químicos e congêneres de maturação, pois, favorecem a extração e as reações químicas levando a uma maior complexidade à bebida.

Os compostos formados durante o envelhecimento, são percebidos com maior intensidade nas cervejas que tiveram um tempo maior em contato com a madeira.

A análise sensorial de componentes principais permitiu identificar diferenças entre as amostras, comprovando que com maior tempo de armazenamento a cerveja ganha mais atributos sensoriais aumentando sua qualidade sensorialmente.

Referências

ACHILLI, G.; CELLERINO, G.P.; GAMACHE, P.H. Identification and determination of phenolic constituents' in natural beverages and plant-extracts by means of a coulometric electrode array system. **Journal of Chromatography**, Baltimore, v. 632, n. 1/2, p. 111-117, 1993.

ALCARDE, A.R.; SOUZA, P.A.D.; BELLUCO, A.E.D.S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 226-232, maio 2010.

ALMEIDA E SILVA, J.B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G.W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgar Blucher, 2005. p. 347-382.

AMARANTE, J.O.A.D. **Os segredos do vinho**. São Paulo: Mescla Editorial, 2005. 568 p.

BAMFORTH, C.W. **Food, fermentation and microorganisms**. Wiley: Blackwell Science, 2005. 230 p.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. Disponível em: http://www.bjcp.org/docs/2008_stylebook.pdf08>. Acesso em: 08 jul. 2015.

BORGES, E.P. Aromas da madeira. **Revista ADEGA**, 2009. Disponível em: <http://revistaadega.uol.com.br/artigo/aromas-da-madeira_5562.html>. Acesso: 21 jul. 2015.

BOSCOLO, M.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D.W. O envelhecimento de aguardente de cana-de-açúcar em tonéis de madeira. **O Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v. 41, n. 1, p. 30-33, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**: regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, 1997. p. 19.556. Disponível em:

<https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 10 jul. 2015.

_____. Instrução normativa n. 24, de 8 de setembro de 2005: Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 09 set. 2005. p. 25-89

_____. **Consulta pública**: portaria DAS/MAPA 30/2013. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.buriti.df.gov.br/ftp/diariooficial/2013/05_Maio/DODF>. Acesso em: 23 jul. 2015.

BREWERSASSOCIATION. **Beerstyleguidelines**. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/attachments/0000/7526/2012_BA_Beer_Styles_Final.pdf> /Acesso: em: 10 maio 2015.

BRIGGS, D.E.; BROOKES, P.A.; STEVENS, R.; BOULTON, C.A. **Brewing**: science and practice. Cambridge: Woodhead Publ., 2004. 848 p.

CABRITA, M.J.; ROQUE, H.; RAQUEL, G.; DIAS, C. Ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e derivados furânicos em aparas de madeira de carvalho francês e americano. In: SIMPÓSIO DE VITICULTURA DO ALENTEJO, 8, 2010, Alentejo. Disponível <http://hdl.handle.net/10174/5871>. Acesso em 06 fev.2014.

CARVALHO, G.B.M.D.; BENTO, C.V.; SILVA, J.B.D.A.E. Elementos biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro. Parte 1: as leveduras. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 36-32, out./nov. 2006.

CEREDA, M.P. Cervejas, In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Biotecnologia**: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgar Blucher, 1985. v. 5, p. 44-78.

CILURZO, V. **Brewing sour beers at home using traditional & alternative methods**. Russianriver Brewing Company. Disponível em <<http://www.chow.com/food-news/54702/vinnie-cilurzo-gets-funky/>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

COLLIN, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods and stability of phenolic compounds in beer: a review. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 1-84, 2009.

CRUZ, J.M.M. Cerveja. In: FONSECA, M.M.; TEIXEIRA, J.A. **Reactores biológicas**. Lisboa; Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

DRAGONE, G.; SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v. 1, p. 15-50.

ESPERANCINE, M.ST. Mercado brasileiro de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Indústria de bebidas**: inovação, gestão e produção. São Paulo: Edgard Blucher, 2011. v. 3, cap. 14, p. 293-322.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. **Analytica-EBC:** Method 8.5 revised Oct. 2000. London: Elsevier, 1963. 78 p.

_____. **Analytica-EBC:** Method 9.8. revised Oct. 2004. London: Elsevier, 1963. 59 p.

JACKSON, M. **Cerveja**. 2. ed. Rio de Janeiro: Zahar. 2007. 250 p.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005. 230 p.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlin: VLB Berlin, 1999. 726 p.

MACCARI-JUNIOR, A. A invasão das amadeiradas. **Revista da Cerveja**, São Paulo, n. 4, p. 70-73, 2012.

MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **STAB. Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v.12, n. 6, p. 29-34, jul/ago. 1994.

MARKOWSKI, P. The world of biere de garde. In: _____. **Farmhouse Ales:** culture and craftsmanship in the Belgian tradition. Boulder:. Brewers Publ., 2004. p. 29-42.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciênc e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 84-89, 2008.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 357 p.

MOSEDALE, J.R. Effects of oak Wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. **Forestry**, London, v. 3, n. 68, p. 203-230, Jan. 1994.

NISHIMURA, K.; MATSUYAMA, R. Maturation and maturation chemistry. In: PIGGOTT, J.R.S.R.; DUNCAN, R.E.B. **The science and technology of whiskies**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. p. 235-263.

NIXON, K.C. Global and Neotropical distribution and diversity. In: KAPPELLE, M. **Ecology and conservation of Neotropical Montane Oak Forests**. Amsterdam: Springer Verlag, 2006. p. 483.

NYKANEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlin: Akademie – Verlag, 1983. 233 p.

OLIVER, G. **The Oxford companion to beer**. New York: Oxford University Press, 2012. 936 p.

PETTERSEN, R.C. In: ROWELL, R. (Ed.). **The chemistry of solid wood**. Washington: American Chemical Society, 1984. p. 57-127.

PORTUGAL, C.; RUIZ-LARREA, F. Comparison of Specific Real-Time PCR and Conventional Culture for Detection and Enumeration of *Brettanomyces* in Red Wines. **American Journal Enology Viticulture**, São Carlos, v. 1, n. 64, p. 56- 69, 2013.

PORTUGAL, C.B.; PALACIOS, A. Vale dos Vinhedos: perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 18-27, 2012.

REINOLD, M.R. O mercado cervejeiro brasileiro atual: potencial de crescimento. **Indústria de Bebidas**, Santo André, v. 10, n. 57, p. 28-29, 2011.

RODRIGUES, N.; GONÇALVES, G.; PEREIRA DA SILVA, S.; MALFEITO FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 90, p. 588-599, 2001.

RUSSEL, I.; STEWART, G.G. Brewing. In: REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Biotechnology**: a multi-volume comprehensive treatise; enzymes, biomass, food and feed. Weinheim: VCH, 1995. p. 419-462.

SCHNEIDER, V. Factores influentes na elaboração de vinhos estagiados em barricas. **VitiTécnica**, Murcia, n. 3, p. 30-33, 2005.

SCHOLTES, C; NIZET, S; COLLIN, S. Occurrence of sotolon, abhexon and theaspirane-derived molecules in Gueuze beers: chemical similarities with 'yellow wines'. **Journal of the Institute of Brewing**, York Share, v.118, p. 223–229, 2012.

SEIDL, C. **O catecismo da cerveja**. São Paulo: Editor SENAC, 2003. 385 p.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 n. 4, p. 902-906, out./dez. 2008.

SPARROW, J. **Wild brews**: beer beyond the influence of brewers yeast. Manchester: Brewers Publ., 2005. 220 p.

TSCHOPE, E.C. **Microcervejarias e cervejarias**: a história, a arte e a tecnologia. São Paulo: Aden, 2001. 223 p.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Bebidas**: tecnologia, química e microbiologia. Zaragoza: Acribia, 1997. 487 p.

VENTURINI, W.G.F. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 223 p.

WALTERS, M . T. Natural antioxidants and flavour stability. In: INSTITUTE OF BREWING OXFORD MEETING, 1996, Oxford. **Proceedings**. p. 111-119.

WHITE, C. **Yeast**: the practical guide o beer fermentation. Boulder: Colorado. Brewers Publ., 2010. 220 p.

WYLER, P. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja**. 2014. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola

Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

3 INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS EM CERVEJAS ENVELHECIDAS EM BARRIS DE MADEIRA

Resumo

Cervejas com qualidade sensorial mais complexa são uma tendência no setor de microcervejarias, e aquelas envelhecidas em barris de madeira constituem, sem dúvida, um diferencial da bebida neste cenário. Este estudo teve por objetivo avaliar a influência de componentes microbianos e componentes químicos da madeira no perfil de cervejas tipo *Flanders Red Ale* envelhecidas em barris de carvalho. A fermentação primária foi conduzida em fermentadores de inox, após resfriamento e separação do fermento decantado da cerveja, a cerveja foi armazenada em barris de carvalho durante três e cinco meses para envelhecimento. Após a maturação, uma cerveja recém elaborada (Young Ale) foi utilizada para a realização de misturas (blends), como previamente descrito no item 2.1.1 do capítulo anterior. As amostras foram engarrafadas e armazenadas à temperatura ambiente por três meses (maturação em garrafa) e analisadas quanto as cargas microbianas e quimicamente detectadas após esse período. A avaliação microbiológica foi feita por plaqueamento em meio seletivo para contagem de bactérias lácticas e acéticas, leveduras totais e leveduras *Brettanomyces*. Os compostos voláteis foram analisados por espectrometria de massa de cromatografia gasosa, e compostos fenólicos por cromatografia líquida de alto desempenho. Populações residuais de bactérias lácticas e acéticas apareceram nas amostras com alguma porcentagem de cerveja envelhecida, mas não apresentaram correlação estatisticamente significativa com os compostos voláteis analisados. O crescimento de leveduras *Brettanomyces*, no entanto, apresentou-se diretamente correlacionado com a quantidade de cerveja envelhecida adicionada ao *blend*, sendo as amostras 2 (33%), 3 (66%) e 4 (100%) mostraram um aumento pronunciado de álcoois superiores, ácido acético, metanol, ésteres e aldeídos. Os resultados mostram que, além das características conferidas pela interação da bebida com a madeira, o perfil sensorial foi fortemente influenciado pela atividade microbiana durante o envelhecimento, particularmente pela ação de *Brettanomyces*, conferindo características organolépticas diferenciais à bebida.

Palavras-chave: Cerveja; Análises químicas; Microbiologia; Barril de carvalho

Abstract

Distinguished quality beers constitute a trend in the sector, and wooden aged ones are undoubtedly a hotspot in this sense. This study aimed to evaluate the influence of microbial and wood components on the chemical profile of *Flanders Red Ale* after aging. Primary fermentation was carried out in stainless vats, and the beer was stored in oak barrels for 90 days. After maturation, a Young Ale was produced and blended with the aged one, as follows: 1 (100% Young Ale); 2 (33% aged), 3 (66% aged) e 4 (100% aged). The samples were bottled and stored at room temperature for three and five months. Microbial assessment was made by plating on selective media for counting of lactic and acetic bacteria, total yeasts and

Brettanomyces yeasts. Volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and phenolic compounds by high-performance liquid chromatography. Residual populations of lactic and acetic bacteria appeared in those samples with some percentage of aged beer, but did not correlated to the compounds analyzed. *Brettanomyces* growth directly correlated to the amount of matured beer added to the blend, and samples 2 (33%), 3 (66%) and 4 (100%) showed an evident increase of higher alcohols, acetic acid, methanol, esters, and aldehydes. Increment of those compounds directly correlated to the viable *Brettanomyces* cells in the samples. The results show that besides the features provided by wood interaction, the sensorial profile is hardly influenced by the post-fermentative microbiota, particularly *Brettanomyces*, that provide differential organoleptic characteristics to the beverage.

Keywords: Beer; Chemical analysis; Microbiology; Oak barrel

3.1 Introdução

Os microrganismos têm a capacidade de produzir uma grande variedade de produtos, pelo que podem desempenhar um papel importante na composição de sabor e aroma em um alimento ou bebida. Por outro lado, a ação inespecífica ou o crescimento descontrolado de alguns microrganismos pode introduzir um componente de contaminação grave e alterar de forma deletéria as características sensoriais do produto (VANDERHAEGER et al., 2003). Embora muitos microrganismos sejam considerados alterantes na maior parte das cervejas, no caso da *Flanders Red Ale* estes desempenham um papel importante e primordial na composição organoléptica da bebida (DAWOUD, 1987). As cervejas do estilo *Flanders Red Ale* ou *Flanders Ale* ácidas, assim como as cervejas estilo *Lambic*, são os únicos estilos de cervejas em que o produto obtido não provém unicamente de uma cultura pura de *Saccharomyces*, mas de uma mistura de um número de diferentes microrganismos atuantes (VERACHTERT et al., 1984).

Leveduras selvagens são consideradas como cepas de leveduras, diferentemente daquelas cultivadas para a fabricação de cervejas de alta e baixa fermentação. Ao se produzir certo tipo de cerveja, com o gênero adequado de levedura, e esta sofrer contaminação por outros organismos, haverá competição por nutrientes do mosto, levando à formação de produtos indesejáveis e/ou alterantes (*off-flavors*). Em caso positivo de contaminação por outro microorganismo, esse pode acarretar problemas referentes ao grau de atenuação final, floculação,

modificação na velocidade de fermentação, além da palatabilidade indesejada (VENTURINI; CEREDA, 2001; VENTURINI, 2005).

Alguns tipos de cerveja utilizam certas cepas de levedura selvagem, em seu processo fermentativo, os quais são relevantes para determinar suas características sensoriais e de identidade. A maioria das cervejas belgas, por exemplo, é fermentada por leveduras especiais, que complementam o convencional processo fermentativo em garrafas. Empregam-se também outros gêneros de leveduras como *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula* e *Pichia* (BAMFORTH, 2005; KUNZE, 1996).

Em relação aos tipos de cervejas, a legislação brasileira define que poderão ser nomeadas como Pilsen, Export, Lager Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt, além de outras designações referentes a outros estilos que são conhecidos mundialmente. Contudo, dentro do estilo de cervejas “Ale” encontramos as *Sour Ales*, que por sua vez se dividem em seis estilos: Berliner Weisse, Flanders Red Ale, Flanders Brown Ale/Oud Bruin, Straight (Unblended) Lambic, Gueuze e a Fruit Lambic (STRONG, 2008). As cervejas Sour Ale, são bebidas ácidas, com forte aroma e sabor de fermentação e, às vezes, chegando a lembrar vinagre (MORADO, 2009). Segundo Strong (2008), o guia de estilos e diretrizes de cervejas *Beer Judge Certification Program* (BJCP), categoriza as *Sour Ales* na numeração 17 de sua classificação, sendo cervejas caracterizadas pelo sabor ácido e aromas azedos devido à interação com microrganismos que habitam os barris de madeira onde as cervejas são maturadas.

A Figura 1 representa a fermentação do mosto cervejeiro de uma cerveja tipo *Lambic*, que conta com a atuação de bactérias e leveduras em diferentes estágios fermentativos. Inicialmente, bactérias e leveduras selvagens predominam e consomem a glicose e transformam em etanol, dióxido de carbono e diferentes ácidos orgânicos. Em seguida, outras leveduras formam etanol adicional. Na terceira fase, bactérias lácticas e acéticas produzem mais ácidos orgânicos e, finalmente, na quarta fase observa-se a atuação de leveduras do gênero *Brettanomyces*, responsáveis pela produção de diversos ésteres (De KEERSMAECKER, 1996).

Figura 1 - Perfil microbiológico de fermentação de cerveja tipo *Lambic*

Fonte: De Keersmaecker (1996)

3.1.1 Flanders Red Ale

O nome deriva da região de Flanders, norte da Bélgica, onde o estilo surgiu no século XVIII. Este é o estilo de cerveja mais parecido com vinho, por sua coloração vermelho-escura e leve toque acético. Bem complexa, apresenta aroma e sabor frutados, com descritores a laranja, cereja e ameixa e leves toques de baunilha que complementam o malte. Tradicionalmente envelhecida por quase dois anos em grandes barricas de carvalho que contêm populações residuais de diversos microrganismos - geralmente leveduras do genero *Brettanomyces* - que atuam e produzem típico teor de ácido acético na bebida (MORADO, 2009; DAENEN, 2008). Após o envelhecimento procede-se a uma mistura com cervejas não envelhecidas para ajustar a acidez e o caráter azedo da bebida.

Diferentemente das cervejas *Lambic*, onde a fermentação primária do mosto cervejeiro se dá por ação de microrganismos presentes no ambiente e passam a fermentar o mosto em recipientes abertos, as *Flanders Red Ale* são inicialmente fermentadas em tanques de aço inoxidável, a temperaturas controladas de 20 a 26°C, com leveduras cervejeiras (*Saccharomyces cerevisiae*). Após a fermentação primária, a cerveja sofre um resfriamento a 0°C que induz a floculação e decantação das leveduras, separando assim a cerveja da biomassa formada durante a

fermentação primária. Após o resfriamento, a cerveja é transferida para barris de madeira onde podem permanecer de cinco meses a dois anos para envelhecimento, a temperaturas de 15 a 20° C. A maturação a temperaturas alevadas, denominada *warm lagering*, tem o objetivo de permitir a influência na bebida de outros microrganismos - bactérias lácticas e *Brettanomyces* - sobreviventes na madeira, acidificando ainda mais o produto final (OLIVER, 2012; WHITE, 2014; DE BRUYNE, 1986).

As bactérias ácido lácticas são microrganismo não esporulantes e Gram-positivas (PRIEST, 1987). Estes microorganismos são comumente reportados como os deteriorantes mais perigosos de cerveja devido à sua natureza microaerofílica, à capacidade de tolerar propriedades antissépticas do lúpulo e de sobreviver a concentrações de até 14% etanol e ambientes de pH muito baixo (DAWOUD, 1987).

A madeira do carvalho pode chegar a abrigar dezenas de variedades de leveduras selvagens, inclusive *Brettanomyces*, que metabolizam os açúcares residuais da cerveja e permitindo uma fermentação de menor intensidade durante a maturação, de modo que a cerveja adquire uma acidez característica, assim como incorpora a cor e sabores da madeira (OLIVER, 2012; DAENEN, 2008; MORRISSEY, 2004). Segundo Daenen (2008), certas linhagens de *Brettanomyces* são essenciais para produzir características de aroma e sabor. Morrissey (2004) cita em um de seus trabalhos o aparecimento deste mesmo microrganismo durante o envelhecimento de cidra irlandesa em barris de madeira e suas características sensoriais favoráveis à bebida.

A principal cervejaria que produz o estilo Flanders Red Ale, é a cervejaria *Rodenbach*, que se especializou durante os seus 160 anos de existência em cervejas denominadas “azedas vermelhas/marrons” (RODENBACH, 2015).

Segundo o guia de estilos BJCP (STRONG, 2008), as características para o estilo da cerveja *Flanders Red Ale* ou *Ale* vermelha de Flanders (Tabela 1), apresenta uma característica de aroma frutado complexo com malte complementando o conjunto. O aspecto do frutado é intenso, com notas que remetem a cerejas negras, laranjas, ameixas ou cassis vermelho. Notas de baunilha e/ou chocolate são comuns. Fenóis condimentados podem estar presentes em pequenas quantidades, adicionando complexidade. O aroma ácido/azedo varia de complementar a intenso. Ausência de aroma de lúpulo. O diacetil, se presente, pode ser percebido em concentrações muito pequenas, apenas como um aroma

complementar. A coloração pode variar de vermelho profundo (bordô) a marrom-avermelhado, com boa limpidez. A espuma varia do branco ao bege, com retenção moderada a acentuada. Quanto ao sabor, o frutado pode ser intenso, com descritores a ameixa, laranja, cerejas negras ou cassis vermelho. Um leve caráter de baunilha e/ou chocolate normalmente presente. Fenóis condimentados podem estar presentes em baixas concentrações adicionando complexidade ao sabor. O caráter ácido/azedo varia de complementar a intenso. Sabores maltosos variam de complementares a proeminentes. Geralmente, com aumento da acidez, o caráter adocicado tende a ocupar um papel de sabor de fundo. O lúpulo encontra-se ausente no sabor e restrito no amargor. Um amargor ácido e taninoso variando de baixo a moderado é comum, proporcionando um final longo e seco característico de vinhos tintos envelhecidos. O diacetil, se presente, pode ser percebido apenas em concentrações muito pequenas, como um sabor complementar. A sensação na boca, aparece como um corpo médio. Carbonatação de média a baixa. Adstringência de baixa a média, comparável à de um vinho tinto envelhecido. Uma acidez que causa um sutil formigamento na língua é comum. Decididamente leve e com final bem definido (*crisp*) no paladar, embora um final mais adocicado não seja incomum. A impressão geral remete a uma *Ale* belga, complexa, ácida, lembrando um vinho tinto.

A longa maturação e a mistura de cervejas jovens com cervejas bem maturadas ocorre com frequência, adicionando suavidade e complexidade; embora a cerveja maturada seja ocasionalmente lançada como uma cerveja para profundos conhecedores. Conhecido como o vinho bordô da Bélgica é o estilo que mais se assemelha ao vinho do que qualquer outro estilo de cerveja. A coloração avermelhada é derivada do malte, porém uma extensa fervura pode contribuir adicionando lindos tons bordô. A maturação também ajuda a escurecer a cerveja. A *Flanders Red* é mais acética e os sabores frutados lembram mais um vinho tinto do que uma *Oud Bruin*. Pode apresentar uma atenuação aparente de até 98%. Os maltes-base são Viena e/ou Munique, com uso de maltes caramelo (*cara-malts*) de claros a médios e uma pequena quantidade de malte *Special*. Lúpulos continentais de baixo teor de alfa-ácido são os mais usados (evitar lúpulos americanos e de alto teor de alfa ácido). Micro-organismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Brettanomyces* e *Acetobacter* contribuem para a fermentação e eventual sabor.

Tabela 1 - Características e faixas de abrangência do estilo Flanders Red Ale

O.G.	1,048 - 1,057
F. G.	1,002 - 1,012
IBU	10 - 25
Cor EBC	20 - 34
ABV	4,6 – 6,5

Adaptado de Beer Judge Certification Program (BJCP, 2008). (OG) gravidade específica original, (FG) gravidade específica final, (IBU) unidade de amargor, (EBC) cor, (ABV) graduação alcoólica

A cepa de levedura presente durante a fermentação primária desempenha um papel importante na determinação do nível de compostos aromáticos presentes na cerveja (THORNE, 1966). Em cervejas Flanders Red Ale, espécies do gênero *Saccharomyces* são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica primária e pela maior parte da atenuação do mosto cervejeiro. As duas principais espécies encontradas em fermentações desse tipo são *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, sendo que ambas são capazes de metabolizar glicose, maltose e também maltotriose (GUINARD, 1990).

A fermentação desse tipo de mosto, utilizando-se leveduras selecionadas, apresenta atenuação de 60 a 64% (3,0 - 3,5°P), que é normalmente chamado de limite de atenuação. Ao contrário de outras cervejas, as Flanders ácidas passam por uma fermentação secundária, aumentando a atenuação do mosto, o chamado “*overattenuation*” ou super-atenuação entre 63 e 83%. Este é o resultado da atuação de leveduras como *Brettanomyces lambicus*, que convertem os açúcares restantes (GUINARD, SHANTHA, 1990).

3.1.2 *Brettanomyces*

Brettanomyces, comumente conhecido como “Brett”, é a designação da forma assexuada ou esporulante da levedura *Dekkera*, comumente associada à deterioração de vinho tinto, cerveja e cidra (RAYNE, 2008). Trata-se de uma levedura com crescimento tipicamente lento e que pode levar vários meses para chegar a marcar sua presença no meio (SHANTHA, 1990). Foi isolada pela primeira vez em 1904, durante o armazenamento de uma cerveja inglesa (JIMENEZ, 1999).

Hjelte Claussen da cervejaria New Carlsberg Brewery foi o primeiro a nomear o microrganismo de *Brettanomyces* para descrever o fermento necessário para desenvolver um lote de cerveja Ale inglesa. Atualmente concebem-se cinco espécies no gênero: *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* e *B. bruxellensis* (WEDRAL, 2010).

Trata-se de uma espécie relativamente comum de levedura, encontrada em diferentes locais e produtos como vinho, cerveja, cidra, vinícolas, cervejarias, equipamentos e barris de carvalho usados para o envelhecimento, etc. (LOUREIRO, 2003). Quando chega a se instalar em uma cervejaria, é extremamente difícil de remover, especialmente pelo fato de propagarem-se normalmente pelo ar (GUINARD, 1990). Nas cervejas tipo *Lambic* não são detectadas antes de oito meses de fermentação/maturação, e as duas espécies que esses processos são *B. bruxellensis* e *B. lambicus*. Estas duas estirpes estarão presentes na cerveja por mais oito meses e são os principais contribuintes do perfil de aroma para esse estilo de cervejas (VAN OEVELEN, 1976). *B. bruxellensis* é a espécie predominante encontrada nas cervejarias que estão localizados dentro dos limites das cidades. Cervejas tipo *Lambic* são tradicionalmente produzidas a partir de uma mistura de culturas de levedura, *Saccharomyces* e *Brettanomyces* (SHANTHA, 1990). Estas últimas são capazes de fermentar muito mais eficazmente em condições de aerobiose, uma habilidade consistente com a característica de formação de biofilmes, películas de microorganismos que podem ser encontradas na superfície da cerveja no interior dos tanques ou nos barris. Muitos cervejeiros que trabalham com este tipo de microrganismo não permitem que esta película seja desfeita ou sofra qualquer dano durante o processo de envelhecimento, devido ao aumento do risco de oxidação, ou seja, a película protege a cerveja de oxidações pelo oxigênio (GUINARD, 1990).

Em condições aeróbicas, estes organismos produzem ácido acético a partir da glicose, podendo causar deterioração na cerveja. No entanto, há algumas evidências de que a celulose desempenhe uma interação com microrganismos durante a maturação de vinhos e cervejas (OLIVER, 2012). Esses microrganismos possuem capacidade de participar das etapas pós-fermentativas, levando à produção de compostos favoráveis a certos tipos de cervejas (HUGHES; BAXTER, 2001; JAY, 2005).

Em 1904, N. Hjetle Claussen, diretor da cervejaria New Carlsberg, em Copenhage, isolou e mostrou para o mundo cervejeiro a *Brettanomyces*. Em um experimento na cervejaria, Claussen identificou em uma cerveja do estilo inglês que estava estocada, uma lenta fermentação secundária na superfície da dorna de fermentação e que essa microfermentação foi feita por esse tipo de levedura, levando à formação de aromas e gosto característicos de cervejas britânicas. De fato, o nome *Brettanomyces* vem do grego e significa “fungo britânico”. (WHITE, 2010).

Alguns dos aromas e sabores formados durante a interação da bebida com microrganismos como a *Brettanomyces* não eram aceitas por cervejeiros devido às características de alta acidez e sabores excessivamente azedos na bebida (JAY, 2005; WHITE, 2010). Não é difícil perceber porque muitos cervejeiros vêem essas características como uma influência negativa ao invés de uma influência positiva. No entanto, essas são as características principais das cervejas *Lambic*, que são bebidas que ainda utilizam o método antigo de fermentação espontânea permitindo a interação do líquido com os microrganismos presente no ambiente. Essas cervejas passam por uma maturação de um a dois anos em barris de carvalho, agregando as características de uma bebida completamente diferente e saborosa (MORADO, 2009). Hoje, as mais renomadas cervejas belgas tais como, Rodenbach Grand Cru, Orval, Cuvée de Tomme, Lambic, usufruem das características fermentativas da *Brettanomyces*, sendo considerados parte integral de seu perfil sensorial (WHITE, 2010). Diversas cervejarias também utilizam leveduras *Brettanomyces* para a obtenção de gosto e aroma característicos como a *Lost Abbey Brewing Company*, de San Marcos, e a *Russian River Brewing Company*, de Santa Rosa, ambas da Califórnia.

As *Brettanomyces* propagam-se muito facilmente nas dependências da fábrica através da poeira, madeira, podendo estar presente também nas superfícies de frutas e folhas, linhas de transferência de cervejas, dentre outros equipamentos, sendo um problema para a indústria cervejeira que não tem o objetivo de utilização deste microrganismo.

Seu comportamento é divergente das outras linhagens comuns, apresentando o efeito *Custer* ou Pasteur-negativo, que é a inibição da fermentação alcoólica na ausência de oxigênio (SCHEFFERS, 1966). Enquanto as linhagens cervejeiras comuns produzem álcool na ausência de oxigênio (fermentação anaeróbia), as *Brettanomyces* produzem álcool mesmo em presença de altas taxas de oxigênio

presente no meio (fermentação aeróbia), transformando glicose em álcool e ácido acético (AGUILAR USCANGA et al., 2003).

Uma das razões pela qual os produtores de vinho se preocupam com a contaminação de *Brettanomyces* é que esses microrganismos consomem açúcares presentes na composição das madeiras utilizadas em barris (FIGURA 2), onde produzem uma enzima denominada β -glicosidase que degrada a celobiose que é um carboidrato que faz parte da composição da madeira e permitem o crescimento destes microrganismos (SHIMWELL, 1947). O processo de queima dos barris de madeira novos ajuda na formação da celobiose, portanto, barris de madeira novos contêm maior teor de celobiose, de modo que esses barris podem ter grande potencial de suporte para as populações de *Brettanomyces* (AGUILAR USCANGA, et al., 2003; SHIMWELL, 1947).

Figura 2 - Quebra da celulose e utilização de celobiose por *Brettanomyces* durante a maturação de vinho

Fonte: Ramiah (1970)

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Análises físico-químicas

Foram feitas análises físico-químicas das cervejas engarrafadas após três meses, as amostras avaliadas das cervejas envelhecidas por 90 e 150 dias em barril

de madeira e seus respectivos blends: 1 (100%young ale), 2 (33% envelhecida), 3 (66% envelhecida) e 4 (100% envelhecida).

As análises se basearam nas metodologias utilizadas nas análises físico-químicas do capítulo 2, como segue: análise de graduação alcoólica, pH, acidez total, cor, compostos fenólicos, amargor, turbidez e análises de congêneres de voláteis (CG-FID): aldeídos (acetaldeído), acetato de etila (ésteres), álcoois superiores (1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico), ácido acético e metanol.

3.2.2. Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas das cervejas envasadas após um período de três meses de maturação em garrafa. As amostras foram diluídas em série e cultivaram-se 100 µL pelo método espalhamento em superfície em meios seletivos para a contagem de organismos viáveis. Os meios MRS-ágar e Manitol-ágar foram empregado, respectivamente, para a contagem de bactérias lácticas e acéticas; o meio YPD para a quantificação de leveduras totais; e o meio DBDM (RODRIGUES et al., 2001) para a determinação das populações de *Brettanomyces*.

As placas com meio MRS foram incubadas a 35°C e em ausência de oxigênio (anaerobiose). As placas de Manitol-ágar foram incubadas em aerobiose, também a 35°C. Os meios utilizados para contagem de leveduras foram incubados a 28°C, em aerobiose. Todos os meios foram mantidos em estufa por até 72 horas, com exceção do meio seletivo para *Brettanomyces* (DBDM), em que as placas mantiveram-se por até 15 dias para a determinação da contagem final de unidades formadoras de colônia (UFC). Somente foram computadas as placas com número de colônias entre 30 e 300, para uma maior precisão das análises.

3.2.3 Meios de cultivo

Os meios de cultivo e seus respectivos inibidores, de acordo com a finalidade do plaqueamento:

- a) YPD sólido: extrato de levedura 10 g/L (Oxoid, Hampshire, England); peptona 20 g/L (Himedia, Mumbai, India); dextrose 20 g/L (Difco, London, England); ágar 15 g/L (Merck, Germany); amoxicilina 50 mg/L (Prati-donaduzzi, London, England); estreptomicina 100 mg/L (Difco, Italy).

- b) MRS-água (Man, Rogosa & Sharpe (Merck, Darmstadt)); nistatina 100 mg/L (Nova Química, Barueri).
- c) Manitol-água: D-manitol 25 g/L (Inlab, Brasil); extrato de levedura 5 g/L (Oxoid, Hampshire, England); peptona 3 g/L (Himedia, Mumbai, India), água 15 g/L (Merck, London); nistatina 100 mg/L.
- d) DBDM (*Dekkera/Brettanomyces Differential Medium*) modificado: Extrato de levedura 10,0 g/L (Oxoid, Hampshire, England); Peptona 20,0 g/L (Himedia, Mumbai, India); Dextrose 20,0 g/L (Difco); Agar 15,0 g/L (Merck); ácido p-coumarico 100 mg/L (Sigma); verde bromocresol 22 mg/L (Vetec, Rio de Janeiro); etanol 10% (v/v); estreptomicina 100 mg/L (NovoZyme, Brasil), ciclohexamida 50 mg/L (Difco); amoxicilina 50 mg/L (Prati-donaduzzi, London).

3.2.4 Identificação de isolados de meio DBDM

Duas colônias detectadas em meio DBDM representativos de cada amostra foram isoladas e crescidas em meio YPD para posterior identificação molecular, de acordo com a metodologia descrita por Portugal e Ruiz-Larrea (2013).

- a) Extração de DNA de isolados: células frescas foram ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,15 M em microtubos; agitaram-se em vórtex e centrifugaram-se em microcentrífuga (6000 rpm, 3 min). Descartou-se o sobrenadante e o pellet de células foi ressuspensado em 200 µL de tampão de lise (Tris 500 mM, pH 8,0; β-mercaptoetanol 100 mM); adicionaram-se 25 µL de liticase (3 mg/mL, Sigma-Aldrich) e incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C durante 25 minutos. Agitou-se o tubo fortemente em vórtex e os tubos foram submetidos a banho de água fervente durante 15 minutos. Após congelar e descongelar, as amostras foram centrifugadas (12000 rpm, 3 min); recolheu-se o sobrenadante em microtubos estéreis para posterior análise molecular.

b) Identificação molecular de isolados em meio DBDM: para identificação específica dos isolados obtidos a partir de meio DBDM utilizou-se o protocolo proposto Kurtzman e Robnett (1998) para identificação de ascomicetos a partir de domínio D1/D2 do gene 26S de DNA ribossomal. As reações realizaram-se em volume final de 50 μ L: 20 μ L da amostra de DNA, 0,5 μ M dos respectivos primers (NL-1 5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL-2 5'- CTT GTT CGC TAT CGG TCT C-3'), 5 μ L tampão de reação 10xNH₄ (Bioline, Reino Unido), 3 μ L solução MgCl₂ 50 mM (Bioline), 0,05 mM de cada desoxirribonucleotídeo (Deoxynucleotide Mix; Sigma), 1,5 U de Taq-polimerase (Bioline). As condições foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 36 ciclos com desnaturação a 94°C durante 1 minuto, alinhamento a 52°C durante 45 segundos, extensão a 72 °C durante 2 minutos. Os produtos amplificados, com aproximadamente 600 pares de bases, foram sequenciados no Lab. Genômica e Biologia Molecular de Plantas (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba). Os cromatogramas das sequências obtidas foram analisados com o software Chromas-Pro (versão 1.49; Technelysium Pty Ltd., Austrália) e utilizou-se a ferramenta de busca BLASTn (National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>]) para comparação com sequências da base de dados GenBank (NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>]) e determinação da espécie.

3.2.5 Análises estatísticas

Os resultados das análises de variáveis microbiológicas, foram submetidos à de funções discriminantes, componentes principais e análise de variância (ANOVA), onde esta última, as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

As análises físico-químicas, compostos voláteis e congêneres de maturação, os resultados foram submetidos à análise de componentes principais, onde este procedimento executa uma análise de componentes principais, com o objectivo da obtenção de um pequeno número de combinações lineares de variáveis que explicam a maior variabilidade dos dados (95,7203% da variabilidade nos dados originais).

As análises foram realizadas com o auxílio do programa STATGRAPHICS Centurion XVI, versão 16.1.02 (32-bits), autorizados pela Stat Point Technologies, Inc. 1982-2010.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Variáveis físico-químicas

As análises de componentes principais das variáveis físico-químicas (graduação alcoólica, pH, acidez total, cor, compostos fenólicos, amargor, turbidez) não revelou diferenças relevantes entre as amostras maturadas por três (Figura 3A) ou cinco meses (Figura 3B), evidenciando perfis de componentes principais similares nos dois casos. No entanto, pode-se verificar que a proporção de cerveja envelhecida no *blend* é diretamente proporcional às concentrações de compostos fenólicos, cor e álcool, mas inversamente proporcional ao grau de turbidez e amargor.

Figura 3 - Gráfico de análise de componentes principais para variáveis físico-químicas

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) — Young Ale, (2) — 33% envelhecida, (3) — 66% envelhecida, (4) — 100% envelhecida. Resultados expressos em raiz quadrada de mg/L

As análises de funções discriminantes para as variáveis físico-químicas (Figura 4) revelaram que pH, teor alcoólico e turbidez foram as que tiveram maior peso na diferenciação das amostras ($p < 0,05$). Na Figura 4, observamos as amostras alocadas em triplicata, na qual houve uma diminuição significativa de pH em relação às amostras extremas 1 e 4, aumento de grau alcoólico maior na amostra 3 e 4 (Figura 4 B) em relação às amostras 3 e 4 (Figura 4 A) possivelmente por ter

sofrido uma micro fermentação dos açúcares residuais da cerveja e diminuição da turbidez, sendo justificada pelo maior tempo de envelhecimento das amostras da Figura 4B em relação às amostras da Figura 4A.

Figura 4 - Análise de funções discriminantes para variáveis físico-químicas de amostras e *blends* de cervejas

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) ■ Young Ale), (2) ● 33% envelhecida), (3) ◆ 66% envelhecida, (4) ▲ 100% envelhecida. Nível de confiança 95,0%

3.3.2 Variáveis de compostos voláteis

Os componentes voláteis (CG-FID): aldeídos, ésteres, álcoois superiores, ácido acético e metanol geralmente sofrem alterações durante o processo de armazenamento em barris de carvalho. O perfil de componentes principais dos compostos voláteis das cervejas envelhecidas por três (Figura 5A) e cinco meses (Figura 5B), foram avaliados.

Os teores mais elevados de ácido acético, aldeídos e álcoois superiores estão diretamente correlacionada com a quantidade de cerveja envelhecida. Aldeído e o conteúdo de álcool superiores se originam da fermentação alcoólica, e são aumentados pela interação entre *Brettanomyces* durante o envelhecimento. As *Brettanomyces* podem formar ácido acético pela oxidação do etanol a acetaldeído e oxigênio presentes no meio. (AGUILAR USCANGA, 2003). Litchev (1989) cita em seu trabalho que o ácido acético e metanol em bebidas também são formados pela degradação da hemicelulose da madeira dos barris.

Figura 5 - Gráfico de análise de componentes principais para variáveis de compostos voláteis

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) — Young Ale, (2) — 33% envelhecida, (3) — 66% envelhecida, (4) — 100% envelhecida. Resultados expressos em raiz quadrada de mg/L

As análises de funções discriminantes para as variáveis de compostos voláteis (Figura 6) nos permite observar uma formação de ácido acético mais evidente 3 e 4 (Figura 6A) maior do que as amostras 1 e 2. Já na Figura 6B, essa formação de ácido acético é claramente percebida nas amostras com algumas porcentagem de cerveja envelhecida e que essa formação é proporcionalmente percebida na formação de ésteres, o é justificado pela presença de *Brettanomyces* no caso da formação de ácido acético e o período maior de envelhecimento na formação de ésteres possivelmente pelo degradação da madeira.

Figura 6 - Análise de funções discriminantes para variáveis de compostos voláteis de amostras e *blends* de cervejas

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) ■ Young Ale), (2) ● 33% envelhecida), (3) ◆ 66% envelhecida, (4) ▲ 100% envelhecida. Nível de confiança 95,0%

3.3.3 Variáveis de congêneres de maturação

As análises de componentes principais (ACP) das variáveis de congêneres de maturação (Figura 7), mostrou uma diferença entre as amostras analisadas de cervejas Young Ale e cervejas envelhecidas por três (Figura 7A) e cinco meses (Figura 7B), as variações são percebidas principalmente pela diminuição do furfural e siringaldeído para as amostras com alguma porcentagem de cerveja envelhecida por cinco meses (Figura B) em relação às de três de envelhecimento (Figura 7A) e inversamente proporcional, houve um aumento da formação de ácido sirínico e ácido vanílico também quando comparado com as amostras com alguma porcentagem de cerveja envelhecida por mais tempo nos barris de carvalho (Figura 7B). Os resultados demonstram que os parâmetros analisados sofreram influência da madeira e que essa influência é determinado pelo maior tempo de contato com a madeira, provavelmente, se deixarmos por um período maior de envelhecimento, esses compostos teriam outro perfil, podendo ser maior ou menor dependendo do estágio das reações químicas pelo período de armazenamento.

Figura 7 - Gráfico de análise de componentes principais das variáveis dos congêneres de maturação

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) — Young Ale, (2) — 33% envelhecida, (3) — 66% envelhecida, (4) — 100% envelhecida. Resultados expressos em raiz quadrada de mg/L

3.3.4 Variáveis microbiológicas

O perfil microbiológico de amostras e *blends* de cervejas (Figura 8), nos mostra que aos três meses de envelhecimento (Figura 8A) pode-se perceber uma correlação direta e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a quantidade de cerveja envelhecida em cada *blend* com a população de *Brettanomyces*. Nesses casos, observa-se que nas amostras com alguma porcentagem de cerveja maturada, a população total de leveduras praticamente equivale à população de *Brettanomyces*. Bactérias lácticas foram isoladas apenas das amostras com 66 e 100% de cerveja maturada ($10^4 - 10^3$ UFC/mL), porém não apresentaram correlação com a quantidade de cerveja envelhecida. Bactérias acéticas foram detectadas com baixa incidência (10 – 100 UFC/mL) em todas as amostras com algum teor de cerveja maturada, mas também não evidenciaram qualquer correlação com as porcentagens utilizadas nos *blends*. Ao compararmos esse perfil microbiológico com o observado aos cinco meses de maturação (Figura 8B), observa-se que houve uma proliferação proporcional de leveduras no dois blends (amostras 2 e 3) e na cerveja 100% envelhecida (amostra 4), sendo que essa população equivalia à contagem de *Brettanomyces* nas amostras (aproximadamente 10^4 UFC/mL). Bactérias acéticas foram isoladas apenas nos blends em número reduzido (< 200 UFC/mL). Já as bactérias lácticas adaptaram-se às condições de maturação na garrafa e, aos cinco meses, desenvolveram-se e permaneceram viáveis em populações moderadas ($10^3 - 10^4$ UFC/mL).

Figura 8 - Perfil microbiológico de amostras e *blends* de cervejas

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) Young Ale), (2) 33% envelhecida), (3) 66% envelhecida, (4) 100% envelhecida. ■ bactérias lácticas, ■ bactérias acéticas, ■ *Brettanomyces*, ■ leveduras totais.

Letras diferentes, significam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

As análises de funções discriminantes das variáveis microbiológicas para três (Figura 9A) e cinco meses (Figura 9B) de envelhecimento, evidenciaram que os componentes de maior peso na diferenciação das amostras foi, por um lado, a população de leveduras do gênero *Brettanomyces* amostras 2, 3 e 4, e, por outro, a incidência de bactérias lácticas que foi mais evidente quanto maior o tempo de maturação em ambiente redutor (garrafa).

Figura 9 - Análise de funções discriminantes para variáveis microbiológicas de amostras e *blends* de cervejas

Cerveja envelhecida por 3 meses (A) e 5 meses (B). (1) ■ Young Ale, (2) ● 33% envelhecida, (3) ◆ 66% envelhecida, (4) ▲ 100% envelhecida. Nível de confiança 95,0%

3.3.5 Conclusões

Bactérias lácticas e acéticas foram detectadas somente nas amostras com alguma porcentagem de cerveja envelhecida, não tendo nenhuma correlação com os compostos voláteis.

Os altos valores de ácido acético e álcool superiores (iso-butanol e álcool isoamílico) estão diretamente correlacionados com alguma porcentagem de cervejas envelhecidas.

A diminuição do aldeído acético ao quinto mês de envelhecimento pode estar relacionado com a maior interação do microrganismo (*Brettanomyces*) diminuindo este composto e favorecendo o aumento de ácido acético.

As populações de *Brettanomyces* nos Blends são diretamente proporcionais à quantidade de cerveja envelhecida.

As quantidades de aldeídos e álcoois superiores que são formados durante a fermentação alcoólica, têm seus valores aumentados durante o envelhecimento da cerveja em barris de carvalho, pela interação com *Brettanomyces*.

As principais contribuições de aromas e sabores das cervejas envelhecidas são originadas pelos altos teores de ácido acético originados por metabolismo acidogênico de *Brettanomyces*.

Os altos teores de etanol encontrados nas cervejas envelhecidas, revela a grande habilidade da *Brettanomyces* atenuar açúcares residuais em condições adversas.

Referências

AGUILAR UACANGA, M.G.; D_LIA, M.L; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 61, p. 157-162, 2003.

BAMFORTH, C.W. **Food, fermentation and microorganisms**. Wiley: Blackwell Science, 2005. 230 p.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. Disponível em: <http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf>. Acesso em: 16 ju. 2015.

CEREDA, M.P. Cervejas, In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgar Blucher, 1985. v. 5, p.44-78.

DAENEN, L.; STERCKX, F.; DELVAUX, F. R.; DERDELINCKX, G. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus L.*) used in the production of special beers. **FEMS Yeast Research**. Belgium, v. 8, p. 1103–1114, 2008.

DAWOUD, E. **Characteristics of enterocateriaceae involved in lambic brewing**. 1987. 100 p. (Dissertation) - Katholieke Universiteit te Leuven, Fakulteit der Landbouwwetenschappen, Leuven, 1987.

DE KEERSMAECKER, J. **The mystery of lambic beer**. 1st ed. Scientific American: New York, 1996. 275 p.

GUINARD, J. X. **Lambic**. London: Brewers Publ., 1990. 159 p.

HUGHES, P.S.; BAXTER, E.D. Beer quality, safety and nutritional aspects. **The Royal Society of Chemistry**, Manchester, v. 10, p. 101-1014, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 230 p.

JIMENEZ, J.; FIDALGO, M. **Brettanomyces**. Columbia: Brewers Association, 1999.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlin: VLB Berlin, 1999. 726 p.

LOUREIRO, V. MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeast in the wine industry. **Journal of Food Microbiology**, New York, v. 86, p. 23 – 50, 2003.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 357p.

OLIVER, G. **The Oxford companion to beer**. New York: Oxford University Press, 2012. 936 p.

PORTUGAL, C.; RUIZ-LARREA, F. Comparison of Specific Real-Time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in Red Wines. **American Journal Enology Viticulture**, New York, v. 1, n. 64, p. 56-69, 2013.

PORTUGAL, C.B.; PALACIOS, A. Vale dos Vinhedos: perfil produtivo de vinícolas familiares e diagnóstico qualitativo, microbiológico e sensorial de vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonçalves, n. 4, p. 18-27, 2012.

PRIEST, F. G.; CAMPBELL, I. **Brewing microbiology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. 120 p.

RAMIAH, M.V. Oak composition and maturation influence. **Journal Applied of Polymer Science**, Oregon, n. 14, p.13-23,1970.

RAYNE, S. EGGERS, N. 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentrations in barreled red wine from the Okanagan Valley appellation. **American Journal Enology and Viticulture**, British Columbia, v. 59, p. 92–97, 2008.

RODENBACH BROUWERIJ. Disponível em:
<<http://www.beeradvocate.com/beer/profile/216/125307/>> Acesso em: 25 mar. 2014.

SCHEFFERS, W.A. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. **Nature**, Oxford, v. 210, p. 533-534, 1966.

SHANTHA, K. H. M. C. **Microbiology and biotechnology of lambic beer overattenuation**. 1990. 230 p. (Dissertation) - Katholieke Universiteit te Leuven, Fakulteit der Landbouwwetenschappen, Leuven, 1990.

SHIMWELL, J.L. The genus *pediococcus*. **American Brewers**, Manchester, v. 80, n. 57, p. 27-29, 1947.

THORNE, R.S.W. **The contribution of yeast to beer flavor**. 2nd ed. London: Brewers Association of American, 1966. 160 p.

VAN OEVELEN, D.; DELESCAILLE, F.; VERACHTERT, H. Synthesis of aroma components during spontaneous fermentation of lambic and gueuze. **Journal Institute of Brewing**. London, v. 82, p. 322–326, 1976.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Bioflavoring and beer refermentation. **Apply Microbiology Botechnology**, London, v.62, p. 140–150, 2003.

VENTURINI, W.G.F. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. 2005. 223 p.

VERACHTERT, H.; DAWOUD, E. Microbiology of lambic-type beers. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 57, p. 11-12, 1984.

WEDRAL, D. SHEWFELT, R; FRANK. J. The challenge fo *brettanomyces* in wine. **Journal of Food Microbiology**. New York, v. 43, p. 1474–1479, 2010.

WHITE, C. **Yeast: the practical guide o beer fermentation**. Boulder: Colorado. Brewers Publ., 2010. 220 p.

APÊNDICES

Apêndice A – Resultados das análises físico-químicas e químicas referentes aos *Blends* de três e cinco meses, Young Ale e controle

	0	3.mês				5.mês			
	Controle	Young Ale	33%	66%	100%	Young Ale	33%	66%	100%
GA	4,94 ± 0,14	4,51 ± 1,10	4,72 ± 0,02	5,10 ± 0,05	5,93 ± 0,08	4,42 ± 0,16	4,68 ± 0,76	5,50 ± 0,013	6,23 ± 0,12
TB	91,06 ± 0,21	94,60 ± 1,23	79,87 ± 2,60	79,40 ± 3,50	65,27 ± 3,37	93,75 ± 1,15	78,34 ± 2,78	78,15 ± 3,20	64,49 ± 3,47
pH	4,87 ± 0,04	4,98 ± 0,01	4,80 ± 0,01	4,69 ± 0,01	4,43 ± 0,01	4,65 ± 0,02	4,51 ± 0,01	4,42 ± 0,01	4,23 ± 0,01
AT	1,14 ± 0,04	1,16 ± 0,02	1,13 ± 0,02	1,25 ± 0,03	1,50 ± 0,05	1,12 ± 0,02	1,15 ± 0,02	1,30 ± 0,01	1,61 ± 0,02
FT	102,88 ± 2,22	101,70 ± 2,39	116,95 ± 2,60	123,35 ± 1,50	128,20 ± 2,25	101,89 ± 2,42	118,34 ± 2,71	126,54 ± 1,70	128,98 ± 2,32
C	28,66 ± 0,14	28,83 ± 0,14	30,25 ± 0,43	31,50 ± 0,25	33,75 ± 0,13	28,70 ± 0,17	32,29 ± 0,20	33,13 ± 0,32	34,15 ± 0,28
A	15,98 ± 0,20	15,47 ± 0,25	14,63 ± 0,20	14,02 ± 0,03	12,38 ± 0,19	15,51 ± 0,23	14,98 ± 0,30	13,45 ± 0,07	11,92 ± 0,29
AD	17,7 ± 0,02	17,9 ± 0,08	19,0 ± 0,01	19,9 ± 0,01	20,8 ± 0,07	1,80 ± 0,06	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
EST	46,7 ± 0,01	45,2 ± 0,33	46,7 ± 0,21	45,4 ± 0,06	46,7 ± 0,30	17,9 ± 0,15	36,0 ± 0,18	63,8 ± 0,29	104,8 ± 0,26
MT	2,00 ± 0,01	1,90 ± 0,01	2,30 ± 0,02	2,60 ± 0,01	2,90 ± 0,08	0,10 ± 0,00	3,80 ± 0,10	4,30 ± 0,06	7,90 ± 0,03
PR	47,1 ± 0,14	43,8 ± 0,32	45,5 ± 0,14	46,0 ± 0,02	43,5 ± 0,45	28,6 ± 0,05	35,9 ± 0,15	40,0 ± 0,14	46,2 ± 0,04
I-B	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,10 ± 0,00	1,70 ± 0,02	1,20 ± 0,02	0,10 ± 0,00
AI	95,7 ± 0,31	89,7 ± 0,26	99,5 ± 0,07	103,2 ± 0,28	104,7 ± 0,58	102,4 ± 0,17	109,1 ± 0,17	117,4 ± 0,20	134,8 ± 0,09
AC	64,1 ± 0,27	57,5 ± 0,51	91,6 ± 0,35	137,2 ± 1,99	173,8 ± 3,62	47,1 ± 0,04	163,7 ± 0,98	200,1 ± 1,07	290,6 ± 3,88
AS	165,4 ± 3,72	155,0 ± 3,48	170,1 ± 3,85	177,8 ± 3,91	179,7 ± 3,93	157,1 ± 4,34	176,9 ± 4,35	195,3 ± 4,53	227,1 ± 5,12
AG	3,59 ± 0,13	3,76 ± 0,39	4,13 ± 0,68	6,17 ± 0,14	6,57 ± 0,29	3,79 ± 0,21	11,13 ± 0,11	12,58 ± 0,10	17,6 ± 0,46
HMF	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,82 ± 0,02	0,99 ± 0,12	1,44 ± 0,23	0,56 ± 0,03	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,04	0,62 ± 0,01
FUR	0,44 ± 0,17	0,40 ± 0,04	1,43 ± 0,18	2,29 ± 0,10	3,31 ± 0,18	0,51 ± 0,08	2,16 ± 0,03	1,18 ± 0,01	1,18 ± 0,04
AV	0,68 ± 0,05	0,73 ± 0,06	0,85 ± 0,17	0,95 ± 0,10	1,01 ± 0,09	0,75 ± 0,03	5,63 ± 0,04	5,58 ± 0,01	4,82 ± 0,14
AS	0,15 ± 0,09	0,14 ± 0,12	0,44 ± 0,04	0,54 ± 0,06	1,27 ± 0,51	0,16 ± 0,01	5,8 ± 0,09	5,09 ± 0,12	4,51 ± 0,02
VN	0,32 ± 0,03	0,36 ± 0,13	0,41 ± 0,1	0,57 ± 0,01	0,68 ± 0,09	0,66 ± 0,06	0,81 ± 0,02	1,46 ± 0,07	2,97 ± 0,09
SG	1,02 ± 0,02	1,00 ± 0,03	2,13 ± 0,09	3,18 ± 0,09	3,88 ± 0,22	1,80 ± 0,01	1,63 ± 0,02	1,50 ± 0,03	1,79 ± 0,06
CO	0,33 ± 0,05	0,35 ± 0,01	0,44 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,52 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,66 ± 0,06	0,64 ± 0,05
SN	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,55 ± 0,03	1,00 ± 0,06	0,41 ± 0,01	0,7 ± 0,07	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,00

Grau alcoólico real (v/v%) (**GA**), Turbidez (NTU) (**TB**), Ph, Acidez total (gH₂SO₄/L) (**AT**), Fenólicos totais (mg/100mL) (**FT**), Cor (EBC) (**C**), Amargor (EBU) (**A**), Aldeídos (mg/100mL de ál. anidro) (**AD**), Esteres (mg/100mL) (**EST**), Metanol (mg/100mL) (**MT**), Propanol (mg/100mL) (**PR**), Iso-butanol (**ISB**), I-butanol (mg/100mL) (**I-B**), Álcool isoamílico(mg/100mL) (**AI**), Ác. Acético (mg/100mL) (**AC**), álc. Superiores (mg/100mL) (**AS**), Ac. gálico(mg/L)(**AG**), 5-HMF(mg/L) (**HMF**), Furfural(mg/L) (**FUR**), Ác. vanílico(mg/L) (**AV**), Ác. Siríngico(mg/L) (**AS**), Vanillina(mg/L) (**VA**), Siringaldeído(mg/L) (**SG**), Coniferaldeído(mg/L) (**CO**), Sinapaldeído(mg/L) (**SP**).

Apêndice B – Modelo de ficha com os descritores confeccionados pelos degustadores, durante a fase de análise sensorial das amostras de cervejas

		Data:	Nome:						
		Número da amostra:	Marcar com um X o valor que perceber: 0 equivale à ausência, 5 equivale a intensidade muito alta						
VISUAL	Âmbar	castanho	0	1	2	3	4	5	
	Amarelo	laranja, dourado	0	1	2	3	4	5	
	Vermelho	cobre	0	1	2	3	4	5	
	Espuma	estabilidade e persistência	0	1	2	3	4	5	
	Limpidez	translúcido	0	1	2	3	4	5	
OLFATIVO	Frutado	maçã, damasco, abacaxi, guaraná, pêssego	0	1	2	3	4	5	
	Vinagre	balsâmico	0	1	2	3	4	5	
	Torrefato	tostado, tabaco, defumado	0	1	2	3	4	5	
	Madeira	amadeirado	0	1	2	3	4	5	
	Especiarias	noz moscada, anis, pimenta	0	1	2	3	4	5	
	Cítrico	casca de laranja, toranja, uva verde	0	1	2	3	4	5	
	Animal	couro, estábulo	0	1	2	3	4	5	
	Terra	musgo	0	1	2	3	4	5	
	Floral		0	1	2	3	4	5	
	Fermento	levedura, pão	0	1	2	3	4	5	
	Fruta-passa	compota, geleia	0	1	2	3	4	5	
	Lácteo	manteiga, leite, iogurte	0	1	2	3	4	5	
	Caramelado	toffe, chocolate, caramelo	0	1	2	3	4	5	
	GUSTATIVO	Vinagre	azedo	0	1	2	3	4	5
Cítrico		limão, laranja, toranja	0	1	2	3	4	5	
Lácteo		manteiga, leite, iogurte	0	1	2	3	4	5	
Fermento		levedura, pão	0	1	2	3	4	5	
Frutado			0	1	2	3	4	5	
Amargor			0	1	2	3	4	5	
Adstringência		tanino	0	1	2	3	4	5	
Frutos secos			0	1	2	3	4	5	
Caramelado		açúcar queimado, toffee, chocolate	0	1	2	3	4	5	
Madeira		tostado	0	1	2	3	4	5	
Metálico		oxidado	0	1	2	3	4	5	
Álcool			0	1	2	3	4	5	
Especiarias			0	1	2	3	4	5	
Fruta-passa		frutas cristalizadas	0	1	2	3	4	5	
RETROGOSTO	Amargor	tanino	0	1	2	3	4	5	
	Persistência		0	1	2	3	4	5	
	Lácteo	manteiga, leite, iogurte	0	1	2	3	4	5	
	Madeira	amadeirado	0	1	2	3	4	5	
	Especiarias	anis	0	1	2	3	4	5	
	Torrefato	caramelo, toffe, café	0	1	2	3	4	5	
	Terra		0	1	2	3	4	5	
	Frutado		0	1	2	3	4	5	
	Vegetal		0	1	2	3	4	5	
	Vinagre	azedo	0	1	2	3	4	5	
Fermento	levedura, pão	0	1	2	3	4	5		