Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras

Giovanni Casagrande Silvello

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

Piracicaba
2019

Giovanni Casagrande Silvello
Engenheiro Agrônomo

Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2019

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

Silvello, Giovanni Casagrande

Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras / Giovanni Casagrande Silvello. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

96 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cerveja 2. Qualidade 3. Envelhecimento 4. Madeiras brasileiras I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pelas virtudes.

Aos meus pais Oscar e Sandra pelo incentivo, por todo suporte e pela educação que eles me proporcionaram.

À minha irmã Milena por todo apoio à minha saúde e bem estar e pelo companheirismo.

À minha querida namorada Alana por todos valores ensinados, pelos conselhos e por sempre apoiar e fazer parte dos meus planos.

Ao meu orientador, professor André, pela confiança e oportunidades oferecidas que tiveram papel fundamental em meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Aos caros amigos e amigas, brasileiros, brasileiras e estrangeiras, Alice, Aline, Amanda, Ana, Karine, MaryAnne, Melissa, Nicolas, Thiago, Zoé Cristina que conheci graças ao Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas, pelas contribuições, trocas de experiências e ajuda na realização deste projeto.

Aos caros amigos da Xão Preto que a ESALQ me apresentou, pelo apoio ao sonho cervejeiro, em alguns casos mesmo distante, e pelas belas recordações.

Aos grandes amigos de longa data do colégio Atlântico e da cervejaria À Tutta Birra pelos bons momentos de descontração e apoio.

Aos queridos amigos da A.A.A.L.Q. e ao time de Tênis de Campo pela injeção de motivação e contribuição à minha saúde.

Aos queridos funcionários e funcionárias do Setor de Açúcar e Álcool pelo auxílio, pela prontidão e pelo bom-humor.

Aos professores e professoras pela contribuição e conhecimento ofertados durante as disciplinas da PG.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e pela disponibilidade.

Aos provadores que participaram da análise sensorial.

Às secretarias da PG pelos esclarecimentos e suporte à conclusão do mestrado.

Aos pesquisadores e pesquisadoras da área de tecnologia e ciência da cerveja pelo legado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa concedida (processo 2016/24158-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Iniciou suas atividades de pesquisa na área de bebidas em 2011 quando ingressou no curso de Engenharia Agronômica na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. No mesmo ano tornou-se estagiário no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas, no qual acompanhou pesquisas com cachaça, uísque e cerveja. Especializou-se em cerveja durante intercâmbio na Université Catholique de Louvain de 2014 a 2015, em Louvain-la-Neuve, período no qual cursou o programa de formação complementar em Mestre Cervejeiro (Génie Brassicole). Durante intercâmbio, realizou pesquisas sobre análise sensorial, cromatografia GC-O e MS novos métodos de extração de compostos derivados de *dry-hopping* em cervejas. Concluiu a graduação em 2016 e iniciou o mestrado no programa de Ciência e tecnologia de Alimentos na ESALQ-USP em 2017.

EPÍGRAFE

“Here's to a long life and a merry one.

A quick death and an easy one. […]

A cold beer and another one!”

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO **8**

ABSTRACT **9**

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO **11**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **13**

2.1. PANORAMA DO MERCADO CERVEJEIRO 13
2.2. MATÉRIAS PRIMAS E PROCESSO DE PRODUÇÃO 13
2.2.1. Água *13*
2.2.2. Malte de cevada *14*
2.2.3. Lúpulo *14*
2.2.4. Leveduras *14*
2.3. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DA CERVEJA 15
2.4. MADEIRAS 16
2.4.1. Estrutura e composição *16*
2.4.2. Tanoaria *19*
2.4.2.1. Secagem 19
2.4.2.2. Tosta e tratamento térmico 20
2.4.2.3. Espécies para tanoaria 20
2.4.2.3.1. Cabreúva ou Cabreúva-parda (*Myrocarpus frondosus* Allemão) 21
2.4.2.3.2. Amburana (*Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith) 21
2.5. ENVELHECIMENTO DE BEBIDAS EM BARRIL DE MADEIRA 22
2.5.1. Reações durante o envelhecimento *22*
2.5.1.1. Via aditiva 22
2.5.1.2. Via subtrativa 23
2.5.1.3. Via interativa 23
2.5.2. Compostos carbonílicos lineares *24*
2.5.2.1. Acetaldeído 24
2.5.2.2. Ésteres 24
2.5.2.3. Álcoois superiores 25
2.5.2.4. Ácido acético 25
2.5.2.5. Trans-2-nonenal (T2N) 26
2.5.3. Compostos carbonílicos cíclicos *26*
2.5.3.1. Compostos fenólicos 26
2.5.3.2. Monofenois 27
2.5.3.3. Furfural e 5-hidroximetilfurfural 28
2.5.3.4. Éter Furfuril-Etílico (EFE) 29
2.5.3.5. Sotolon 29
2.5.3.6. β-damascenona 30
2.6. ANÁLISE SENSORIAL 30

3. MATERIAL E MÉTODOS **33**

3.1. LOCAL 33
3.2. PREPARO E ENVELHECIMENTO DA CERVEJA 33
3.3. INDICADORES DE QUALIDADE EM CERVEJA 34
3.4. ANÁLISE CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO DE CHAMAS (GC-FID) 35
3.5. ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO 35
3.5.1. Meios de cultivo *35*
3.6. ANÁLISE SENSORIAL 36
3.6.1. Provadores *36*
3.6.2. Treinamento do Painel *36*
3.6.2.1. Gostos básicos 36
3.6.2.2. Familiarização com as Madeiras Empregadas no Estudo 37
3.6.2.3. Apresentação de Referências 37
3.6.3. Amostras *38*
3.6.4. Metodologias *39*

3.7. ANÁLISE DE DADOS 39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1. ACOMPANHAMENTO MICROBIOLÓGICO 41
4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 42
4.2.1. Análise multivariada dos resultados físico-químicos 44
4.2.2. Análise univariada dos compostos voláteis 53
4.2.2.1. Acetaldeído 55
4.2.2.2. Acetato de Etila 56
4.2.2.3. Álcoois Superiores 56
4.2.2.4. Ácido Acético 57
4.2.3. Análise univariada dos parâmetros físico-químicos 58
4.2.3.1. Fenólicos 58
4.2.3.2. Amargor 59
4.2.3.3. Coloração 62
4.2.3.4. pH 64
4.3. RESULTADOS SENSORIAL 65

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 73

REFERÊNCIA 75

APÊNDICES 89

ANEXOS 95

RESUMO

Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras

O setor cervejeiro está em expansão tanto no Brasil quanto no mundo. Nos últimos anos, tem ocorrido uma expansão de microcervejarias que buscam produtos com qualidade diferenciada, atendendo a um número crescente de consumidores mais exigentes. O envelhecimento da cerveja possibilita diversificação e inovação do produto. O objetivo deste trabalho foi acompanhar a evolução na composição química da cerveja envelhecida e a influência sensorial do processo de envelhecimento em barris de dez litros de diferentes madeiras: Carvalho Americano (*Quercus alba*), Amburana (*Amburana cearensis*) e Cabreúva (*Mycrocarpus frondosus*); durante 6 meses. Amostras de cervejas armazenadas em barris de carvalho foram analisadas mensalmente. A comparação das características químicas e sensoriais das cervejas envelhecidas com a cerveja não envelhecida permitiram o conhecimento das modificações ocorridas ao longo do tempo e a determinação da qualidade do produto e características sensoriais. As amostras foram avaliadas mediante análises de indicadores de qualidade de cerveja, tais como grau alcoólico, pH, cor, compostos fenólicos totais e amargor; além de método cromatográfico (CG-DIC) para detalhar perfil de compostos aromáticos da bebida envelhecida. Testes sensoriais holísticos foram aplicados ao final dos processos para avaliação das amostras. Obtiveram-se parâmetros necessários para caracterizar o processo de envelhecimento da cerveja armazenada em barris de diferentes madeiras. O tratamento prévio dos barris garantiu estabilidade microbiológica durante o envelhecimento da cerveja durante os primeiros meses. A evolução da composição geral da cerveja do tipo Barleywine foi distinta em cada madeira, bem como as características sensoriais observadas segundo diferentes metodologias (*Napping* e *Ultraflash profile*). As cervejas envelhecidas em madeiras brasileiras se destacaram quanto ao teor de compostos fenólicos totais e diferiram entre si quanto aos parâmetros físico-químicos de coloração e medida de amargor.

Palavras-chaves: cerveja; qualidade; envelhecimento; carvalho; madeiras brasileiras.

ABSTRACT

Chemical quality and sensory profile of beer aged in barrels made of different woods

The beer industry is expanding both in Brazil and in the world. In recent years microbreweries have been expanding, seeking products with differentiated quality to serve a growing number of discerning consumers. Aging beers enable product diversification and innovation. The objective of this work was to follow the evolution of the chemical composition and the influence on sensory profile of aging beer in ten-litter barrels made of different woods: American oak (*Quercus alba*), Amburana (*Amburana cearensis*) and Cabreúva (*Mycrocarpus frondosus*); during six months. Samples of beers stored in new barrels made of different woods were analyzed monthly. The comparison of chemical and sensorial characteristics between aged and non-aged beer allowed the knowledge of the changes that have occurred over time and the determination of the optimum quality product and sensory aspects. Samples will be evaluated through quality analysis, such as alcohol content, pH, color, total phenolics and bitterness. The profile of congeners and aromatic compounds were analyzed by chromatographic method (GC-FID). Holistic sensory tests were applied at the end of the maturation processes for evaluation of the samples. The barrel previous treatment assured beer microbiological stability during the first months of aging process. General composition evolution of the Barleywine beer was distinct for each wood, as well as sensory characteristics observed through different methods (Napping and Ultraflash profiling). Beers aged in brazilian-wood barrels highlighted regarding their total phenolic contente and differentiated from each other after physic-chemical parameters namely color and bitterness.

Key-words: beer; quality; aging; oak; Brazilian woods.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O setor cervejeiro está em expansão tanto no Brasil quanto mundialmente. Atualmente há 610 cervejarias no Brasil, sendo a maior parte delas pequenas cervejarias categorizadas como "artesanais" ou "microcervejarias" (MARCUSSO; MULLER, 2017), as quais produzem cervejas diferenciadas que atendem a um número crescente de consumidores que apreciam cervejas de qualidade. Neste sentido, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas propondo o desenvolvimento de novos processos e produtos para atender o setor crescente, cada vez mais fortalecido pela contínua inovação e pela competição entre empresas do ramo.

Com o aumento do poder aquisitivo da população, as cervejas artesanais ganham mercado em nosso país por ser um produto diferenciado, normalmente empregando diferentes matérias-primas (adição de ingredientes regionais como rapadura, café, mel, frutos, ervas etc.) além do malte de cevada, dos lúpulos, da água e da levedura. Cervejas envelhecidas em barris de carvalho são produzidas por cervejarias belgas, que as armazenam por até dois anos, com a finalidade de acrescentar sabores e aromas, aumentando a qualidade da bebida (SCHOLTES; NIZET; COLLIN, 2012). Maccari Júnior (2012) citou a introdução das cervejas amadeiradas no mercado brasileiro, principalmente utilizando o carvalho na maturação das cervejas. Contudo, na literatura, não são encontrados dados que revelem detalhadamente a interação entre a cerveja e a madeira ao longo do envelhecimento.

Historicamente, tanques de madeira eram usados para fermentar e maturar cervejas sem a intenção de que o produto final adquirisse suas características, por isso os barris recebiam um tratamento interno de resina, ou então eram lavados com água quente e ácido clorídrico (OLIVER, 2012), para inibir a ação da madeira na modulação dos aromas e sabores da bebida. Na década de 90 a utilização de madeira na maturação reapareceu nos Estados Unidos com o crescimento das "cervejarias artesanais", mas neste caso com a intenção de que a cerveja adquirisse compostos da madeira ou da bebida que foi anteriormente armazenada no barril, como vinho, conhaque, uísque e rum (CANTWELL; BOUCKAERT, 2016). Atualmente muitas cervejarias utilizam barris de madeira para fermentar e maturar a cerveja, especialmente na Bélgica, Inglaterra e Estados Unidos (OLIVER, 2012), com o objetivo de aumentar a complexidade sensorial do produto, agregar valor e gerar inovação. No Brasil esta técnica é recente e começou a ganhar projeção há menos de cinco anos. O período de maturação pode durar de semanas a anos, dependendo do tipo de cerveja e do resultado pretendido.

Normalmente a cerveja passa por um longo período de maturação nesses barris e depois é misturada a uma cerveja jovem para equilibrar a acidez adquirida no processo. Do ponto de vista físico-químico a maturação no barril de madeira se diferencia por permitir uma série de reações que não acontecem no aço inoxidável, material amplamente utilizado devido a facilidade de limpeza e sanitização. Enquanto este é impermeável e não reage com o líquido, a madeira libera substâncias que interagem com a composição da cerveja em maturação e permite a difusão de gases. Os poros da madeira permitem a entrada de ar, ocasionando uma lenta oxidação. Além disso, microrganismos instalados no interior das aduelas podem realizar uma segunda fermentação dos carboidratos residuais presentes na matriz cerveja. Ao longo do processo de envelhecimento, as interações físico-químicas entre a madeira e a bebida são inúmeras, ocorrendo diversos fenômenos de migração de constituintes não voláteis e voláteis da madeira, a evolução de componentes fenólicos, aeração da bebida, estabilização da cor e do sabor e o surgimento do caráter amadeirado que contribui para a riqueza e complexidade do buquê aromático (RAMIREZ-RAMIREZ, 2002). Segundo Oliver (2011) cervejas maturadas em barris que já foram utilizados na maturação de outras bebidas incorporam algumas notas de sabores da bebida anteriormente armazenada.

A madeira de carvalho é a principal madeira utilizada no envelhecimento de bebidas alcoólicas, adquirindo supremacia mundial, pois participa ativamente do *flavour* da bebida de qualidade graças à extração de moléculas aromáticas (RAMIREZ-RAMIREZ, 2002). Esta madeira é explorada para envelhecimento de diversas bebidas (*cognac*, uísque, cachaça, vinho, grapia etc.), e além da madeira de carvalho, algumas espécies madeiras nacionais vêm ganhando espaço no meio cervejeiro, como a amburana (*Amburana cearensis*) que já é bastante difundida na indústria de aguardente envelhecida (LEÃO, 2006; BORTOLETTO; ALCARDE, 2013). As madeiras nacionais representam uma alternativa de obtenção mais fácil e que permite a diversificação de bebidas pela pluralidade de compostos aromáticos que às compõem (DIAS; MAIA; NELSON, 1998).

A maioria dos estudos sobre evolução de características físico-químicas e sensoriais da cerveja ao longo do tempo avaliam parâmetros relacionados a produtos envelhecidos em garrafa, que perdem as características originais ao longo do tempo de estocagem (NOËL et al., 1999; GJIS et al., 2002; SAISON et al., 2009). Estas reações são resumidas na formação de compostos ditos marcadores de envelhecimento, que caracterizam uma cerveja como "velha", e normalmente correspondem a compostos considerados indesejáveis (ou *off-flavours*). A associação destes marcadores a características de aromas indesejados é totalmente influenciada pelo tipo do principal objeto de estudo de evolução de compostos, ou seja, cervejas claras, normalmente do tipo *lager* e com baixo teor alcoólico que devem ser consumidas em curto prazo.

Segundo Vanderhaegen et al. (2006), a apreciação dos consumidores está diretamente relacionada às expectativas de aromas e sabores para uma marca de bebida usualmente consumida, e como o envelhecimento da cerveja em garrafa altera a composição aromática da bebida, o padrão apresentado pelo produto é perdido, ou seja, aromas e sabores de cerveja fresca são transformados. Em um estudo realizado com consumidores por Stephenson e Bamforth (2002), foi conclusivo que nem sempre os marcadores de cerveja envelhecida em garrafa são caracterizados como aromas indesejáveis, o que reforça a ideia de expectativa sobre produto como pretexto para qualificar um aroma como desejável ou indesejável. Essa justificativa sobre o processo de aceitação pelo consumidor viabiliza o envelhecimento de cerveja em barris de madeiras, visando à obtenção de novos produtos com características sensoriais atribuídas por estes recipientes ativos.

O objetivo deste trabalho foi acompanhar a evolução da composição química da cerveja envelhecida em barris de Carvalho Americano (*Quercus alba*), Amburana (*Amburana cearensis*) e Cabreúva (*Mycrocarpus frondosus*) durante 6 meses. As transformações da cerveja foram avaliadas segundo análises dos indicadores de qualidade da cerveja ao longo do período, tais como grau alcoólico, pH, cor, compostos fenólicos totais e amargor. Também foi verificada a modificação na composição volátil da cerveja por meio de análise cromatográfica (GC-FID). Ao final do processo de envelhecimento, as características sensoriais das amostras obtidas foram analisadas por meio de uma metodologia holística para melhor compreender os atributos que indicam semelhanças e diferenças entre os diferentes tratamentos testados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PANORAMA DO MERCADO CERVEJEIRO

O mercado mundial de cervejas está em franca expansão. Estima-se que as receitas mundiais do mercado cervejeiro devem aumentar em 2,4 % ao ano durante o período de 2016 até 2020 (INFINITI RESEARCH LIMITED, 2016). Neste segmento, segundo o mesmo estudo de mercado, os grandes grupos cervejeiros AB-InBev, Carlsberg, Heineken e SABMiller devem contar com inovação de produtos para obter a taxa de crescimento indicada. Além disso, alguns pequenos grupos que apresentam cervejas "especiais" em seus portfólios são promissores neste período de crescimento da indústria cervejeira mundial.

No Brasil, o setor cervejeiro representa 1,6 % do PIB e é responsável por criar 2,2 milhões de empregos. Em termos de produção de cerveja, com 14,1 bilhões de litros, o Brasil já ultrapassou a Alemanha, ficando atrás somente da China e dos Estados Unidos. Com relação ao consumo per capita, o país ocupa a 27ª posição, com 66,9 litros, enquanto que os tchecos, austríacos e alemães ficam no topo (CERVBRASIL, 2016).

Estes dados de consumo nacional, embora discretos quando comparado ao de outros países, seguem uma tendência de aumento, em decorrência da qualificação da produção, melhoria da renda populacional e da difusão do conhecimento sobre bebidas no país.

A concorrência do setor cervejeiro tem levado a uma dinamização de cervejas diferenciadas, que além de muito rentáveis, são um forte mercado em expansão, apresentando crescimento dobrado frente às cervejarias convencionais. É um mercado com um grande potencial a ser explorado (ESPERANCINI, 2011). Dentro desse segmento, vários fatores têm contribuído para a melhoria do processo e qualidade do produto, tais como escolha e qualidade de matérias primas empregadas, melhorias no processo de produção e técnicas de produção.

2.2. MATÉRIAS PRIMAS E PROCESSO DE PRODUÇÃO

2.2.1. Água

A água, não diferente dos demais componentes, é um dos principais fatores a serem levados 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 quantidade, visto que 85 a 95 % do volume da cerveja é água (KUNZE, 2004).

A água cervejeira deve ser insípida e inodora para não interferir nas propriedades organolépticas da cerveja pronta, e pode ser obtida por sistemas de tratamento como filtração em celulose, osmose reversa, passagem em carvão ativado com o intuito de eliminar cloro ativo (HOUGH et al., 1982) e tratamento UV.

Correções são feitas após estes tratamentos. O pH da água deve encontrar-se entre 4,5 a 5,8 (TSCHOPE, 2001), faixa na qual as enzimas do malte podem ser ativadas e iniciarem a atuação sobre o amido de forma a transformá-lo em açúcares fermentáveis. É também nesta faixa de pH que ocorrem as extrações das moléculas amargas e aromáticas do lúpulo, bem como uma boa formação de complexos proteína-polifenol, que leva à formação da borra (*trub*) após a fervura.

2.2.2. Malte de cevada

A cevada é uma gramínea do gênero *Hordeum* e cultivada principalmente em regiões de clima temperado. Na América do Sul a Argentina é a grande produtora (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA E SILVA, 2007).

O grão de cevada é submetido a um processo de germinação controlada (maltagem), promovendo modificação física e química. Fisicamente ocorre a formação de radículas e da acrospira (precursora da primeira folha) e quimicamente se dá a formação das enzimas (α-amilase, β-amilase, dextrinase, endo-peptidase, exo-peptidase) que irão quebrar o amido e as proteínas no ponto adequado para o início da produção da cerveja durante a fase de mosturação (TSCHOPE, 2001).

A utilização da cevada para fabricação de malte e, posteriormente, da cerveja é justificada pelo alto potencial deste grão em apresentar a relação entre quantidade de carboidratos e proteínas necessária para fornecer nutrientes para as leveduras (BRIGGS et al., 2004).

2.2.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta da família *Cannabinaceae* típica de regiões frias, mais precisamente entre os paralelos de latitude 35 e 55°, sendo produzido principalmente pelos EUA, Alemanha, República Tcheca, Polônia, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China, Chile e Argentina (TSCHOPE, 2001). Desta espécie dióica, só têm interesse cervejeiro as plantas femininas não fecundadas. O lúpulo, além de aroma e amargor, apresenta ação anti-séptica e contribui para a estabilidade da espuma da cerveja (ALMEIDA E SILVA, 2005).

As flores femininas do lúpulo contêm as brácteas e as bractéolas que formam glândulas onde são produzidos os grânulos de lupulina, que é substância responsável por conferir o amargor e o aroma característico da cerveja (ALMEIDA E SILVA, 2005). O lúpulo constitui-se de óleos essenciais (0,2-3 %), de β-ácidos ou lupulonas (1,5 – 9,5 %) e de α-ácidos ou humulonas (2,0 – 16,0 %). Os óleos essenciais são muito voláteis, sendo de 96 a 98 % perdidos durante a fervura do mosto. A pequena quantidade restante sofre oxidação que caracteriza o caráter aromático à cerveja (TSCHOPE, 2001).

A quantidade de amargor depende da concentração de α-ácidos insolúveis que são isomerizados durante a fervura do mosto gerando os compostos iso-α-ácidos, que são mais amargos e mais solúveis. O lúpulo de amargor é adicionado no início da fervura do mosto, processo no qual ocorre a isomerização dos ácidos de amargor. O lúpulo aromático, por sua vez, geralmente é adicionado no final da fervura do mosto (TSCHOPE, 2001).

2.2.4. Leveduras

Para a transformação dos açúcares disponíveis no mosto em etanol e gás carbônico são utilizadas leveduras do gênero *Saccharomyces*. As cepas responsáveis por esse processo são as *Saccharomyces cerevisiae* tipo *lager* e tipo *ale*, que são utilizadas na produção dos dois grandes estilos de cervejas, as de baixa e as de alta fermentação. A baixa fermentação é conduzida sob temperatura de 7 a 15 °C durante 7 a 10 dias. Ao final do processo as leveduras tendem a se sedimentar no fundo do tanque, originando a cerveja denominada tipo *Lager*. A alta fermentação é conduzida entre 18 e 25 °C por um período de 3 a 5 dias (TSCHOPE, 2001).

2.3. Processo de fabricação da cerveja

A cerveja é uma bebida maltada resultante da fermentação alcoólica do extrato aquoso do malte de cevada com lúpulo (WALKER, 2000). No entanto, a legislação brasileira permite que parte do malte de cevada (até 45 %) seja substituída por adjuntos, que podem ser cereais (milho, trigo, aveia), maltados ou não, bem como amidos e açúcares de origem vegetal (DRAGONE; SILVA, 2010).

A legislação brasileira para cervejas segue o Decreto no 6.871, de junho de 2009, que regulamentaa lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, Seção III, onde pode ser verificada a descrição do que é cerveja. Cerveja é 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. 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). A cerveja contem ainda CO_2, etanol, vários sais inorgânicos e cerca de 70 compostos orgânicos (CARVALHO; BENTO; ALMEIDA E SILVA, 2007).

O processo tradicional de obtenção de cerveja consiste basicamente em duas etapas: produção do mosto cervejeiro e produção da cerveja (KUNZE, 2004). Durante a fabricação do mosto cervejeiro, ocorre o processamento do grão maltado rico em amido (normalmente cevada, mas, em geral, qualquer cereal) até sua transformação em um líquido formado principalmente, por açúcares fermentescíveis.

A etapa de produção do mosto se inicia com a moagem do malte em moinhos regulados (KUNZE, 2004) de forma a expor seu conteúdo amiláceo que é transformado em açúcares fermentescíveis e preservar as cascas do malte que servirão como elemento filtrante. O *grist*, ou malte moído, segue para o processo de mostura que consiste na adição de água à fonte amilácea, aquecimento em rampas de temperatura (KUNZE, 2004) para ativação de enzimas (e.g. proteases, amilases etc.) que transformarão a matriz original na base do mosto. Este processo também é denominado sacarificação (KUNZE, 2004) pois é a etapa que corresponde à transformação de amido em açúcares.

Em seguida a parte líquida, que consiste basicamente em açúcares e demais nutrientes para a levedura, é separada da parte sólida composta por embriões e cascas íntegras por meio de uma filtração, na qual o elemento filtrante são as próprias cascas do malte (KUNZE, 2004). Em seguida, a parte líquida passará pela etapa de fervura na qual ocorrem: extração e transformação de compostos vindo dos lúpulos (adicionados nesta etapa), precipitação de complexo proteína-polifenol, evaporação de água, eliminação de carga microbiológica, desativação de enzimas, incremento de coloração, formação de substâncias redutoras e eliminação de compostos indesejados via aquecimento (KUNZE, 2004).

Após o processo de fervura, os sólidos em suspensão, tais como resto de lúpulo e complexos de proteína-polifenol são eliminados, seja por decantação forçada (w*hirpool*) ou natural (tanque de sedimentação) (KUNZE, 2004). Após o processo de eliminação de sedimentos após a fervura, ocorre o resfriamento do mosto para uma temperatura próxima à temperatura de fermentação. O mosto resfriado é então oxigenado e acondicionado em tanques de fermentação, onde ocorrerá o processo de produção da cerveja após adição da levedura (*S. cerevisiae*). A fermentação se passa em tanques cilindro-cônicos e a temperatura é controlada durante o processo segundo o estilo de cerveja e a cepa de levedura empregada (*ale* ou *lager*).

Após terminada a fermentação, o processo de maturação é iniciado. Segundo Kunze (2004), o processo de maturação corresponde ao processo no qual a cerveja é saturada com gás carbônico, ocorre a remoção de sedimentos que causam turvação da cerveja (clarificação) e no qual ocorre a transformação de aromas, como a

eliminação do diacetil. A clarificação pode ocorrer durante período longo e temperaturas baixas (entre -2 e 0 ºC), e podem também ser adicionados agentes clarificantes. Em seguida a cerveja pode ser filtrada para eliminar quaisquer leveduras ainda em suspensão (KUNZE, 2004). Em seguida é realizado o envase, seja em garrafas (e passam por pasteurização) recebendo a denominação "cerveja", seja em barris, sem passar por pasteurização e garantida a estabilidade biológica de outra forma (e.g., refrigerado durante todo o transporte), denominado "chope" (BRASIL, 2009).

2.4. Madeiras

O uso de barris de madeira para acondicionar bebidas alcoólicas é uma prática que acompanha o homem desde a antiguidade. Os recipientes empregados para armazenamento de bebidas alcoólicos variavam de ânforas de barro e cantis de couro de animais, a barricas de madeira de diferentes tamanhos. Os recipientes neutros, ou seja, aqueles que não alteravam propriedades da bebida armazenada devido às suas composições só surgiram com o advento das técnicas de moldagem do vidro.

Estudos e pesquisas sobre os compostos da madeira que são extraídos pelas bebidas que passam algum tempo em barris são bastante recentes quando comparado à prática deste processo. Compete ao envelhecimento de bebidas alcoólicas em barris de madeira as transformações de compostos das duas fases, sejam elas a adsorção de compostos da bebida na madeira, a extração alcoólica e solubilização de compostos da madeira, e/ou as reações de transformação entre os compostos da bebida. Este conjunto de reações varia para os diferentes tipos de bebidas (destiladas ou fermentadas) e para diferentes tipos de madeiras (espécies, floresta de origem, processo de fabricação do barril).

O uso de barris de madeiras brasileiras é bastante disseminado entre os produtores de cachaça para o envelhecimento desta bebida destilada, porém os estudos de caracterização de diferentes espécies de madeiras nacionais são relativamente recentes (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; BORTOLETTO, 2016; BORTOLETTO; ALCARDE, 2013). Pesquisas elucidaram quais os compostos fenólicos são encontrados em maior concentração em diferentes cachaças envelhecidas em barris de diferentes madeiras, o que dá um panorama geral sobre as possíveis características de bebidas alcoólicas que passem pelo contato com estes barris. Os tonéis de Amburana (*Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith) conferiram à cachaça alta concentração principalmente de ácido vanílico e sinapaldeído (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; BORTOLETTO, 2016), enquanto os barris de Cabreúva, ou bálsamo (*Myrocarpus frondosus* Allemão), proveram cachaças com concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural semelhante aos barris de carvalho (*Quercus* sp.) (BORTOLETTO, 2016), madeira mais empregada no envelhecimento de bebidas, porém não produzida no Brasil. Barris de carvalho conferem maior teor de congêneres de envelhecimento à cachaça (BORTOLETTO, 2016) por apresentar teores elevados de diferentes compostos fenólicos: ácido gálico, vanilina, siringaldeído, ácido siríngico e coniferandeído.

2.4.1. Estrutura e composição

A composição e a estrutura da madeira irão influenciar diretamente no potencial de exploração da espécie para uso em tanoaria, na velocidade das reações entre compostos da madeira e da bebida durante o envelhecimento e na composição química da bebida após extração de compostos da madeira durante o processo de armazenamento (Tabela 1). O etanol e a água presente na cerveja vão favorecer a extração e a degradação de certos grupos de moléculas estruturais da madeira, principalmente a lignina (SINGLETON, 1995).

Tabela 1. Composição e densidade de diferentes espécies de madeiras empregadas na tanoaria e envelhecimento de bebidas.

Madeiras	**Composição (%)**				**Densidade básica ($g \cdot cm^{-3}$)**
	Holocelulose	**Lignina**	**Extrativos**	**Minerais**	
Carvalho (*Quercus* sp.)	65,2	25,9	10,5	0,5	0,626
Amburana (*Amburana cearensis*)	59,1	27,4	17,9	0,6	0,557
Bálsamo (*Myroxylon peruiferum*)	63,6	26,1	10,5	0,5	0,815

Fonte: Adaptado de Mori et al. (2003)

Os poros do barril de madeira o caracterizam como um recipiente ativo, ou seja, permeável a trocas entre o meio interno (bebida) e o meio externo (ambiente). A permeabilidade gasosa destes poros garante que haja a entrada de oxigênio por diferença de concentração entre a bebida e o ambiente, o que caracteriza o processo de micro oxidação da bebida durante envelhecimento. Este processo lento de oxidação da bebida leva à formação de um buquê aromático mais intenso e complexo ao longo do tempo (CONNER; REID; JACK, 2003).

A diferença da porosidade dentre as diferentes espécies de madeira é dada principalmente pelas características de cada espécie arbórea, além de características regionais das florestas onde são cultivadas: regime pluvial, temperatura média (que influencia na velocidade de crescimento) e concentração de gás carbônico atmosférico (OVERDIECK; ZICHE; BÖTTCHER-JUNGCLAUS, 2006).

A contribuição da madeira na concessão de aromas e sabores à bebida durante o processo de envelhecimento está relacionada à composição química não apenas estrutural, mas também dos extrativos (BRITO; GOMES DA SILVA, 2005), também denominados compostos acidentais, que correspondem a substâncias solúveis em solventes orgânicos neutros como etanol, e da forma de processamento da madeira antes de sua transformação em barris (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990; LEÃO, 2006; FIGUEREDO et al., 2013).

Quanto ao extrativos, deve-se levar em conta o processo de evolução das madeiras ao longo de dezenas de anos de crescimento. Estas apresentaram modificações na constituição química e físico-química (FEUILLAT; HUBER; KELLER, 1993) causada pelas mudanças fisiológicas do vegetal (LEÃO, 2006). As modificações de constituição química são ocasionadas por profundas mudanças metabólicas de células parenquimáticas que outrora armazenavam substâncias de reserva energética como o amido, e passam a perder vitalidade até o estágio de morte celular. A partir destas substâncias de reserva, são sintetizados compostos formadores da fração denominada "extrativos da madeira" (LEÃO, 2006), como os compostos fenólicos que podem apresentar propriedades desde concessão de cor para a madeira até funções gustativas e de aroma (POLGE, 1984).

A composição fenólica da madeira é constituída por grupos de fenólicos funcionais livres que variam de estruturas simples, como a vanilina, até estruturas poliméricas de taninos condensados. Os extrativos fenólicos são solúveis em solventes polares, como acetona ou etanol, e em solução alcoólica de carbonato de sódio. A classificação destes extrativos pode ser dada em: taninos hidrolisáveis, flavonoides (estrutura base de taninos condensados), lignanas (condensação oxidativa de unidades de fenilpropano), derivados de estilbenos, e tropolonas (caracterizados por anéis insaturados de sete carbonos) (BAEZA; FREER, 2000).

Estruturas fenólicas grandes podem ser hidrolisadas ao longo do tempo de envelhecimento ou durante o processo de fabricação, como é o caso da cerveja, e passam a apresentar menor peso molecular e, portanto, maior atividade e potencial de aroma nas bebidas alcoólicas que as solubilizaram. Os monofenois são compostos fenólicos oriundos deste processo de degradação de grande extrativos (BAEZA; FREER, 2000) que apresentam grande contribuição na formação do perfil sensorial de bebidas alcoólicas envelhecidas em barris de madeira (BOSSO et al., 2008; POISSON; SCHIBERLE, 2008; STERCKX; SAISON; DELVAUX, 2012).

Monofenois são normalmente encontrados em cervejas pois são oriundos de extrativos presentes nas principais matérias primas amiláceas empregadas no processo de fabricação: maltes de trigo (CZERNY; SCHIEBERLE, 2002) e cevada (FICKERT; SCHIEBERLE, 1999), e cuja extração é favorecida pelo processo de fabricação da cerveja em etapas que demandam aporte de energia térmica (KUNZE, 2004). O teor de compostos fenólicos e a variedade destes compostos na cerveja dependem do tipo de malte empregado, ou seja, o grau de torrefação deste elemento que engloba temperatura e tempo de secagem, bem como o controle do teor de umidade durante este processo.

Durante o processo de maltagem ocorre a formação de monofenois ligados a glicosídeos, de forma que as características aromáticas atribuídas a estes compostos fenólicos só aumentam após o processo fermentativo, quando as leveduras consomem os açúcares atrelados aos precursores e formam os monofenois livres (STERCKX; SAISON; DELVAUX, 2012). Para esta mesma classe de compostos fenólicos oriundos da madeira, a liberação de moléculas de monofenois ocorre pelo processo de degradação durante o processo de estocagem da madeira em pátios antes da fabricação dos barris (Figura 1), quando ocorre a interação do meio ambiente e de microrganismos nativos da madeira na degradação da lignina (VIVAS; GLORIES, 1997; CANTWELL; BOUCKAERT, 2016), e também intensamente durante o processo de tosta do interior dos barris, correspondente à reação de degradação térmica (STERCKX; SAISON; DELVAUX, 2012).

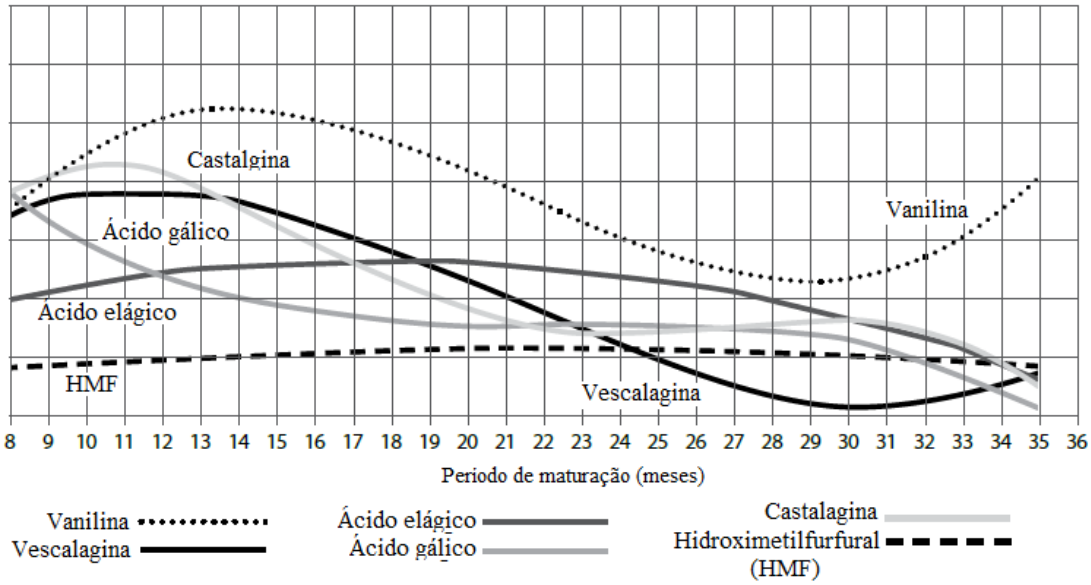


Figura 1. Evolução do teor de compostos fenólicos derivados da lignina da madeira empregada na fabricação de barris durante maturação das mesmas em pátio da tanoaria Adaptado de Cantwell e Bouckaert (2016).

2.4.2. Tanoaria

2.4.2.1. Secagem

O processo de secagem que acontece em tanoarias consiste no procedimento de desidratação da madeira até o ponto de equilíbrio higrométrico em relação ao ambiente (LEÃO, 2006). Este procedimento garante a estanqueidade do barril que será confeccionado, uma vez que o preenchimento com líquido garante a dilatação do diâmetro das fibras da madeira em aproximadamente 50 % do diâmetro original (BRITO; GOMES DA SILVA, 2005), mas para que haja expansão das fibras, a umidade original da madeira para confecção do tonel deve ser baixa.

O processo de secagem pode ser realizado artificialmente em estufas ou então ao ar livre, que se trata de um processo demorado, porém garante a aquisição de características gustativas e aromas mais agradáveis (CHATONNET, 1995a). Durante a exposição da madeira em pátios, a evolução dos compostos é influenciada por variáveis como clima (chuva, sol, vento, variação térmica), manejo da madeira no pátio e fatores biológicos (desenvolvimento de fungos e bactérias) (PONTALIER, 1981; VIVAS; GLORIES, 1997; VIVAS, 1998; LEÃO, 2006). Ao ar livre, dificilmente a madeira atinge a umidade ideal de trabalho próxima de 12 %, para tanto são empregadas estufas de secagem artificial para finalizar o processamento da matéria prima para fabricação de barris (CHATONNET, 1995a).

Ao sofrer com a incidência de chuvas, ocorrem modificações na composição da madeira por meio da lixivia de compostos hidrossolúveis, como os elagitaninos. Este processo ocorre durante os primeiros seis meses de secagem enquanto a madeira ainda é verde e rica em umidade. No restante do tempo de armazenamento em pátios, que pode se estender por 24 meses (LEÃO, 2006), durante a fase de perda de umidade, ocorre o aprisionamento de extrativos nas fibras da madeira. Além disso, o estabelecimento de fungos na superfície das madeiras dá-se por meio de esporos que desenvolvem em micélios que penetram por fissuras da madeira e colonizam inclusive camadas mais internas e modificam a estrutura e composição desta matéria prima da indústria tanoeira.

De acordo com Leão (2006), esta prática comum em tanoarias francesas, nem sempre é observada no Brasil por tratar de uma estocagem economicamente inviável, o que pode acarretar baixa qualidade da madeira para produção de barris e envelhecimento de bebidas alcoólicas.

2.4.2.2. Tosta e tratamento térmico

O processo de termotratamento da madeira serve a dar forma típica ao barril, uma vez que o efeito da elevação da temperatura gera flexibilidade das aduelas (peças correspondentes a tiras de madeira que compõem o tonel) e torna sua curvatura possível, denominado processo de "cintragem" (LEÃO, 2006). Este efeito é intensificado pela presença de água no processo (CHATONNET, 1995b) por tornar celuloses e hemiceluloses mais modeláveis. Em seguida, cintas metálicas são ajustadas no entorno dos barris para manutenção de seu formato e garantir a resistência mecânica dos mesmos.

O processo de conformação do barril é dado incialmente por meio de aquecimento brando e atinge temperaturas entre 40 e 140 °C, em seguida a "cintragem" se passa a 200 °C e dura alguns minutos. Este aquecimento promove a queima da superfície interna do barril e confere ao barril sua forma definitiva.

Além da mudança estrutural, o processo de queima do interior dos barris é responsável por modulação não apenas da composição de monofenois (MAGA, 1989; STERCKX et al., 2012), mas também de uma diversidade de outros compostos por vias de pirólise e hidrotermólise (BOIDRON; CHATONNET; PONS, 1988). O termotratamento de madeiras é responsável por redução em parâmetros como teor de extrativos totais, teor de lignina solúvel, teor de polifenois totais, extrato seco e aumento de parâmetros como lignina insolúvel e compostos de coloração (LEÃO, 2006).

Em estudo de Leão (2006), foi realizada a comparação entre o extrativo alcoólico de madeira de Amburana natural e termotratada (175 °C durante 120 minutos). O autor verificou que o tratamento térmico realizado sobre *Amburana cearensis* aumentou a quantidade de compostos voláteis, principalmente 1-dodecanol, dihidrocumarina e 2-etil-hexanoico e eliminou em quantidade massiva um ácido graxo não identificado. No mesmo estudo, o autor investigou outra espécie brasileira de madeira, o Bálsamo (*Myrixylon balsamum* (L.) Harms.), e observou o aumento de vanilina (aldeído fenólico) por degradação térmica da lignina e diminuição da concentração de sesquiterpenos após termotratamento, como o eudesmol.

2.4.2.3. Espécies para tanoaria

O uso da madeira para confecção de barris com finalidade de envelhecer bebidas passou ao longo do tempo por uma ampla seleção, uma vez que sempre se buscaram espécies capazes de fornecer extrativos às bebidas alcoólicas de forma contribuir para o incremento da qualidade sensorial (SINGLETON, 1974; VIVAS, 1998). O incremento sensorial pode corresponder a mudanças gustativas, olfativas e de coloração da bebida em contato com a madeira (LEÃO, 2006), as quais dependem de propriedades físicas e químicas da espécie florestal (GRAFF; TCHELISTCHEFF, 1969).

Esta seleção fomentada pela qualidade das características da madeira levou à popularização do emprego de carvalho (*Quercus* sp.), principal fonte abastecedora do mercado mundial de produtos de tanoarias (LEÃO, 2006). A hegemonia do carvalho, com espécies *Quercus petraea* e *Quercus robur* na Europa e *Quercus alba* na América do Norte,

é devida a um conjunto de características somadas que tornam o gênero *Quercus* sp. favorável no processo de envelhecimento de bebidas: excelente porosidade a gases e alta impermeabilidade a fluídos, composição de extrativos que conferem aromas e sabores favoráveis, possibilidade de formação de diversas moléculas odorantes durante a queima do barril, possibilidade de eliminar moléculas que atribuem características desfavoráveis durante o processo de secagem da madeira, resistência a ataques por microrganismos, alta durabilidade, relativa leveza, propriedades físicas e mecânicas favoráveis como dureza, flexibilidade e resistência (PONTALIER et al., 1982; PUECH, 1984; FEUILLAT; HUBER; KELLER, 1993; MAGA, 1989; LEÃO, 2006).

A disponibilidade de outras espécies com aptidão para tanoaria é importante para cenário brasileiro, uma vez que o Brasil abriga em seus biomas o equivalente a 20 % do número total de espécies do planeta (BRASIL, 2016). Bortoletto e Alcarde (2013) avaliaram composição de aguardentes de cana de açúcar envelhecidas em barris de diferentes espécies arbóreas nativas do Brasil, com relação aos congêneres de maturação. Os autores verificaram a composição semelhante de espécies brasileiras de jequitibá rosa (*Cariniana legalis*) e amburana (*Amburana cearensis*), em relação ao carvalho europeu (*Quercus sessilis*), quanto aos compostos fenólicos vanilina, ácido vanílico e sinapaldeído. Madeiras como a Cabreúva- e o Amendoim, foram investigadas quanto à composição por Silva et al. (2012), por meio de espectroscopia, e foram encontradas altas concentrações de aldeídos cinâmicos (sinapaldeído e coniferaldeído) nestas espécies.

Além destes marcadores de envelhecimento, outras classes de compostos podem atribuir características favoráveis a bebidas envelhecidas em barris de madeiras de outras espécies. Diversas madeiras brasileiras podem ser exploradas em vista a conferir atributos sensoriais a bebidas alcoólicas envelhecidas (AMPESE, 2011; BORTOLETTO; ALCARDE, 2013).

2.4.2.3.1. Cabreúva ou Cabreúva-parda (*Myrocarpus frondosus* Allemão)

Esta espécie de madeira da família Leguminosae e subfamília Faboide, apresenta ocorrência vasta pelo território brasileiro: do Sul do estado da Bahia até o estado do Rio Grande do Sul. A madeira é pesada, seu cerne pode variar de coloração entre pardo claro rosado a acastanhado, apresenta textura média e uniforme, moderada resistência ao apodrecimento e baixa resistência ao ataque de cupins e média elasticidade à flexão (MAINIERI; CHIMELO, 1989).

Quanto ao processo de secagem desta madeira, deve-se controlar adequadamente ao ar livre para evitar incidência de defeitos (JANKOWSKY et al., 1990). Em sua casca e lenho foram observados por Sakita e Valilo (1990) a presença de alcaloides e cumarinas. Os autores constataram que esta espécie apresenta grande concentração de resina no lenho, e quando perfurada por trado exsuda líquido aromático escuro, e a serragem da madeira é empregada na indústria de perfume e tinturas.

2.4.2.3.2. Amburana (*Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith)

Esta espécie da família das fabáceas tem ocorrência ampla no território brasileiro e se estende do estado do Ceará ao norte da Argentina, com maior ocorrência na caatinga nordestina e nos estados do Espírito Santo e Minas Gerais. Os nomes populares desta espécie são: Cerejeira, Amburana, Cumaru do Ceará, Umburana, Imburana (LEÃO, 2006). Esta espécie é caracterizada por ser moderadamente pesada e apresentar cerne uniforme de coloração

amarelado, e possuir aroma peculiar agradável que remete a baunilha e com gosto levemente adocicado (MAINIERI; CHIMELO, 1989). Por estas características, trata-se de uma espécie indicada para tanoaria (LORENZI, 1992).

Estudos qualitativos sobre os extrativos desta identificaram a composição dos óleos essenciais desta espécie (FIGUEREDO et al., 2013; CABRERA et al., 2015). Foram identificados por Cabrera et al. (2015), na composição terpênica dos óleos essenciais, o biciclogermacreno como composto principal, que é descrito por remeter a aromas vegetais (QIAO et al., 2008), além de β-cariofileno. limoneno e terpineol. A proporção entre estes compostos depende dos fatores edafoclimáticas onde a madeira foi colhida.

Figueredo et al. (2013) verificaram a presença de diversos compostos bioativos em oriundos de extrativos da Amburana, dentre eles taninos pirogalatos, compostos fenólicos antocioânicos, antocianidinas, flavonas, flavonóis, chalconas dentre outros. Estes compostos identificados apresentam propriedades antimicrobianas (O'KENNEDY; THOMES, 1997; DJIPA; DELMÉE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; ESQUENAZI et al., 2002) e podem ter papel importante na estabilidade microbiológica durante o envelhecimento de cervejas.

2.5. Envelhecimento de bebidas em barril de madeira

Uma série de características químico-físicas da espécie de madeira irá influenciar diretamente em sua aptidão para envelhecimento de bebidas, com relação tanto à empregabilidade da madeira para fins de tanoaria quanto aos compostos químicos que determinarão características sensoriais da bebida envelhecida.

Características de rigidez, maleabilidade e resistência da madeira são primordiais para determinar a aptidão da espécie à fabricação de barris (CANTWELL; BOUCKAERT, 2016). A qualidade do barril está, portanto, diretamente relacionada ao tipo de fibras da madeira e a sua porosidade. Os poros do barril de madeira o caracterizam como um recipiente ativo, ou seja, permeável a trocas entre o meio externo (ambiente) e o meio interno (bebida). A permeabilidade gasosa destes poros garante que haja a entrada de oxigênio por diferença de concentração entre a bebida e o ambiente, o que caracteriza o processo de micro oxidação da bebida durante envelhecimento. Este processo lento de oxidação da bebida leva à formação de um buquê aromático mais intenso e complexo ao longo do tempo (CONNER; REID; JACK, 2003).

Além da transformação oxidativa de compostos devida à estrutura física da madeira, ocorrem alterações de composição da cerveja via extração e a degradação de diferentes grupos de moléculas estruturais da madeira, principalmente a lignina (SINGLETON, 1995) pelo etanol e pela água.

2.5.1. Reações durante o envelhecimento

2.5.1.1. Via aditiva

A via aditiva, que ocorre durante o envelhecimento de bebidas, corresponde à simples extração dos constituintes da madeira pela bebida. A matriz líquida, composta principalmente por água e etanol, é capaz de solubilizar ácidos voláteis e não voláteis, açúcares, ácidos graxos, triglicerois, taninos, lactonas, terpenos e fenois voláteis (BORTOLETTO, 2016). A extração destes compostos pode ser superficial, quando a cerveja entra em contato com a superfície interna das aduelas no barril de madeira em um primeiro momento, ou pode ocorrer pela penetração da bebida entre as fibras da madeira, atingindo os primeiros milímetros internos das aduelas ao longo do

tempo durante o processo de envelhecimento. Pelo processo dinâmico da bebida dentro do barril, algumas moléculas são carregadas para a grande massa de líquido no interior do barril. A dissolução de alguns compostos da madeira é possível graças ao grau de solubilização aumentado por reações de hidrólise, pirólise e oxidação durante o processo de produção dos barris, da secagem e estocagem da madeira verde até o processo de maturação da madeira e a tosta interna dos barris (CONNER; PATERSON; PIGGOTT, 1989; SINGLETON, 1995, MOSEDALE; PUECH, 1998).

Além da extração de blocos derivados da quebra da lignina, responsáveis por originar compostos denominados "marcadores de envelhecimento" ou "congêneres de maturação", outras moléculas presentes em bebidas envelhecidas somadas por meio da via aditiva são o furfural e o hidroximetilfurfural, degradados a partir da celulose e hemicelulose, os ácidos elágico e gálico, originados a partir da extração de taninos hidrolisáveis, e as lactonas, geradas a partir da oxidação sob alta temperatura de ácidos graxos da madeira.

2.5.1.2. Via subtrativa

O barril de madeira consiste num recipiente não inerte para envelhecimento de bebidas, e além da contribuição para a transformação da bebida em seu interior por adição de compostos via solubilização e degradação do etanol, a madeira permite a ocorrência de algumas vias subtrativas como oxidação, evaporação e adsorção de compostos da bebida (CONNER; REID; JACK, 2003).

No início do processo de envelhecimento da bebida, o barril deve ser completamente preenchido por líquido para evitar exposição excessiva ao oxigênio (REAZIN, 1981), entretanto, com o passar do tempo, a bebida é absorvida pela madeira e penetra em suas fibras e o volume interno do barril é tomado por gás atmosférico que entra pelos poros da madeira. Além de permitir a entrada de gases, os poros permitem a saída de compostos voláteis, principalmente compostos sulfurosos normalmente considerados indesejados em bebidas (CONNER; REID; JACK, 2003).

2.5.1.3. Via interativa

Uma série de reações químico-físicas ocorrem durante o envelhecimento de bebidas alcoólicas (BORTOLETTO; SOUZA; ALCARDE, 2014). Ao se tratar de bebidas fermentadas, além das influências da madeira e da composição da matriz (bebida), ainda existem interferências possíveis por vias de biotransformação. O conceito de "via interativa" no contexto de transformações de compostos no envelhecimento de cerveja pode ser explicado por fenômenos metabólicos desempenhados por microrganismos (CALLEJO; GONZALEZ; MORATA, 2017) presentes na cerveja envelhecida (oriundos da cerveja ou do barril de madeira), juntamente a vias de transformação decorrentes da ação de enzimas presentes na matriz líquida (LENTZ, 2018).

O complexo metabólico desempenhado por bactérias láticas, bactérias acéticas, ou então por leveduras não-*Saccharomyces* resultará em mudanças nas características sensoriais da cerveja envelhecida (VAN OEVELEN et al., 1977; SÚAREZ et al., 2007; MICHEL et al., 2015). Durante o envelhecimento da cerveja, o desenvolvimento de diferentes espécies não-*Saccharomyces* ocorre de maneira sucessiva (VAN OEVELEN et al., 1977) e altera profundamente as características de aroma e sabor da bebida, trazendo maior complexidade para o produto (CALLEJO; GONZALEZ; MORATA, 2017). A formação de compostos fenólicos voláteis, como 4-etil-guaiacol e

4-etil-fenol (SÚAREZ et al., 2007), e ésteres, como etil-lactato ou 2-feniletil acetato, são as principais contribuições da via de biotransformação e podem agregar aromas terroso, de café, de frutas vermelhas, até notas florais (BARTHELMEBS; DIVIES; CAVIN, 2000; MICHEL et al., 2015).

Concomitantemente às vias interativas do envelhecimento da cerveja, a presença do oxigênio pode modular o metabolismo dos microrganismos presentes na matriz líquida, favorecendo a formação de biofilme (ČÁP; VÁCHOVÁ; PALKOVÁ, 2012). Além de exercer influência nas vias de biotransformação, o oxigênio que entra no barril pode promover a oxidação de álcool em aldeídos, em seguida oxidados a ácidos carboxílicos, o que contribui com incremento da acidez da bebida (REAZIN, 1981).

2.5.2. Compostos carbonílicos lineares

A Tabela 2 mostra os principais compostos carbonílicos voláteis da cerveja e seus limiares de percepção (em $mg \cdot L^{-1}$), segundo Meilgaard (1975) e Saison et al. (2008).

Tabela 2. Compostos carbonílicos voláteis da cerveja e seus limiares de percepção (em $mg \cdot L^{-1}$) (MEILGAARD, 1975; SAISON et al., 2008).

Composto	Limiar de percepção ($mg \cdot L^{-1}$)
Acetaldeído	10 - 20
Acetato de etila	20 - 40
Propanol	800
Álcool isoamílico	70
Ácido acético	60 - 120

2.5.2.1. Acetaldeído

O acetaldeído é o principal aldeído presente em bebidas alcoólicas e sua formação é explicada pela reação de oxidação do etanol, principal álcool originado pelo processo fermentativo. Em bebidas fermentadas, o acetaldeído desempenha importante papel na formação do perfil aromático por apresentar notas de "maçã verde" (WHITE, 2010) ou até notas "químicas" e "sensação pungente" (FERREIRA; LOPEZ; CACHO, 2000). Seu limiar de percepção é relativamente baixo (Tabela 2), entre 10 e 20 $mg \cdot L^{-1}$ (MEILGAARD, 1975).

Pela principal via de formação deste composto consistir na oxidação do etanol, o processo de envelhecimento da cerveja pode favorecer a formação deste composto pelo processo de oxigenação lenta da bebida que preenche o barril de madeira.

2.5.2.2. Ésteres

O principal éster encontrado na cerveja e em bebidas alcoólicas em geral é o acetato de etila, originado a partir da reação de esterificação que envolve ácido acético e etanol (NORDSTRÖM, 1962). O acetato de etila confere aroma "frutado" às bebidas e, em maior concentração, notas de "solvente" (MEILGAARD, 1975; WHITE,

2010; ZHUANG, 2017). Os demais ésteres da cerveja podem ser agrupados em etil-ésteres originados a partir de ácidos graxos de cadeia curta e acetatos derivados de reações com ácido acético (PIRES et al., 2014). Segundo Pires et al. (2014), os ésteres mais importantes, além do acetato de etila, são o acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de feniletila (aroma de rosas), acetato de isobutila (aroma frutado) hexanoato de etila (aroma de maçã) e octanoato de etila (aroma de maçã azeda).

Durante o processo de envelhecimento da cerveja, ocorrem transformações da composição de ésteres (PIRES et al., 2014), o que provoca a evolução das características aromáticas da bebida. Além de vias químicas como hidrólise e esterificação catalisadas por ambiente ácido (VANDERHAEGEN et al., 2006), existem vias de transformação bioquímicas que envolvem a reação de esterases remanescentes no meio advindas do processo de autólise celular em cervejas não pasteurizadas (NEVEN; DELVAUX; DERDELINCKX, 1997). Estas vias de transformação de ésteres levam à formação de etil-nicotinato (aroma de anis, medicinal), etil-piruvato (grama cortada) e etil-lactato (frutado, amanteigado) (SAISON et al., 2009). Microrganismos nativos da madeira, como leveduras selvagens não-*Sacharomyces* podem ainda alterar o perfil de ésteres caso haja açúcar residual na cerveja envelhecida e originar compostos como hexanoato e octanoato de etila, lactato de etila (CRAWELS et al., 2015).

2.5.2.3. Álcoois superiores

Os álcoois superiores possuem grande influência na formação dos sabores e aromas característicos de bebidas. O álcool isoamílico está associado aos aromas de "malte", "vínico", "banana" e "doce" (ZHUANG et al., 2017). Os álcoois superiores são importantes também pelas suas características como solventes, atuando sobre outras substâncias aromáticas alterando seus coeficientes de atividade e limiares de odor (AMERINE; OUGHT, 1976).

Os principais álcoois superiores da cerveja correspondem: ao n-propanol, cuja faixa normal de concentração na bebida varia entre 4 e 17 $mg \cdot L^{-1}$ e descritor de aroma corresponde à característica de "solvente"; ao isobutanol, com concentrações normais na cerveja entre 4 e 60 $mg \cdot L^{-1}$ e atributo aromático correspondente a "alcoólico" e "maltado"; e o álcool isoamílico, com teores médios entre 5,6 e 140,0 $mg \cdot L^{-1}$ para cervejas de diferentes tipos e descritor de aroma que confere características "adocicadas" e "frutadas" (ZHUANG, 2017). A produção de álcoois superiores pelas leveduras está diretamente relacionada ao crescimento celular e ao metabolismo de aminoácidos na glicólise (KRUGER, 1998; HAZELWOOD et al., 2008).

2.5.2.4. Ácido acético

O ácido acético é o principal ácido orgânico volátil formado rapidamente ao início da fermentação alcoólica da cerveja, parte deste metabólito é consumida em um segundo momento e volta a aumentar de forma considerável ao final do processo fermentativo (WHITING, 1976). O tipo de fermentação alcoólica do mosto cervejeiro está diretamente relacionado com a concentração de ácido acético formado, dependente da cepa de levedura empregada e da temperatura de fermentação (WHITE, 2010). Os teores de ácido acético normalmente encontrados em cervejas de diferentes estilos varia entre 30 e 200 $mg \cdot L^{-1}$ (MEILGAARD, 1975; SAISON et al., 2009).

Durante o envelhecimento de bebidas, pode-se observar o aumento do teor de ácido acético na matriz líquida. Este incremento é dado ao longo do período de envelhecimento e pode ser devido a uma série de fatores no

caso da cerveja. Com relação à composição do barril, o ácido acético pode ser gerado pela degradação da hemicelulose no processo de tratamento térmico da madeira, que gera também metanol e 5-hidroximetilfurfural (LITCHEV, 1989; NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989). O aumento em concentração da ácido acético durante o período de envelhecimento pode ser também devido ao metabolismo de microrganismos presentes na madeira. Populações residuais de leveduras do gênero *Brettanomyces* são encontradas em barris para envelhecimento de cervejas azedas belgas (*Flanders Red Ale*) e responsáveis pela geração característica de concentrações elevadas de ácido acético na bebida (DAENEN, 2008; MORADO, 2009; WHITE, 2010; ANGELONI, 2016). Outra via de formação de ácido acético em bebidas envelhecidas é explicada pela reação de oxidação do etanol, via de maior importância em bebidas com teor alcoólico mais elevado como aguardentes, uísque, conhaque (CARDELLO; FARIA, 2000; MIRANDA et al. 2008; BORTOLETTO, 2016). O etanol é o álcool mais abundante em bebidas fermentadas e destiladas, e a oxidação deste composto forma o acetaldeído, que por uma sucessiva reação oxidativa leva à formação do ácido acético

2.5.2.5. Trans-2-nonenal (T2N)

O trans-2-nonenal (T2N) corresponde a um indicador de degradação de cervejas envelhecidas em garrafa e é um aldeído considerado o maior responsável por atribuir aroma de papelão à cerveja (JAMIESON; VAN GHELUWE, 1970; COLLIN; NOËL, 1994). O desenvolvimento deste composto na cerveja durante seu armazenamento por longo período de tempo em garrafa está relacionado à dissociação de complexos formados por proteínas e aminoácidos e o T2N durante o processo de fabricação da cerveja (NOËL; COLLIN, 1995). Sob forma de complexo, esta molécula de aroma fica protegida contra a redução pela levedura durante o processo fermentativo, e passa para o produto final até que sofra a liberação quando estiver sob condições de baixo pH na cerveja engarrafada ao longo do tempo (COLLIN et al., 1997; LERMUSIEAU et al., 1999).

2.5.3. Compostos carbonílicos cíclicos

2.5.3.1. Compostos fenólicos

Em bebidas envelhecidas em barris de madeira, a lignina é o principal composto estrutural precursor de compostos denominados "marcadores de envelhecimento", principalmente em bebidas destiladas. Blocos monoméricos estruturais derivados da lignina são liberados por ação do etanol e podem passar por duas vias de formação de marcadores de envelhecimento: a via do siringil, que engloba o sinapaldeído, o siringaldeído e o ácido siríngico; e a via do guaiacil, que compreende o coniferaldeído, a vanilina e o ácido vanílico (Figura 2). Ambas as vias representam sequências oxidativas (PUECH, 1981; DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AYLOTT; MACKENZIE, 2010)

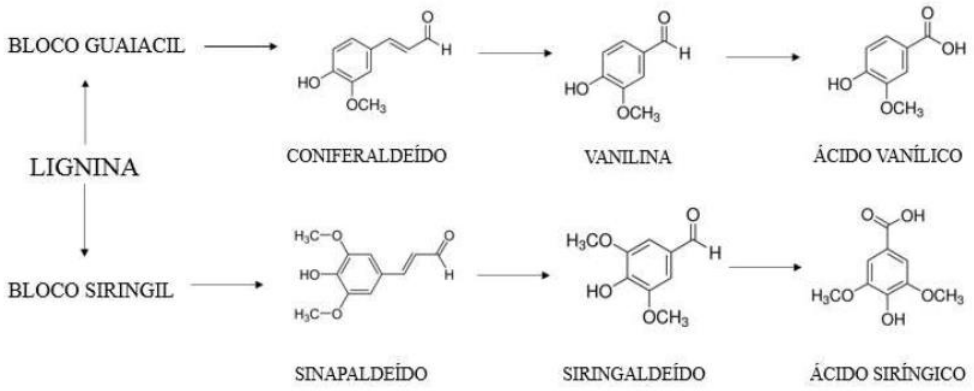


Figura 2. Vias oxidativas dos marcadores de envelhecimento originados pela degradação da lignina (BORTOLETTO, 2016).

2.5.3.2. Monofenois

Os monofenois são compostos fenólicos oriundos de diversas matrizes vegetais, sendo a madeira uma das fontes mais citadas quanto a estes compostos, de forma que apresentam grande contribuição na formação do perfil sensorial de bebidas alcoólicas envelhecidas em barris de madeira (BARRERA-GARCÍA et al., 2007; BOSSO et al., 2008; POISSON; SCHIBERLE, 2008; STERCKX et al., 2012). Estes compostos são normalmente encontrados em cervejas pois são oriundos das principais matérias primas amiláceas empregadas no processo de fabricação: maltes de trigo (CZERNY; SCHIEBERLE, 2002) e cevada (FICKERT; SCHIEBERLE, 1999).

Durante o processo de maltagem ocorre a formação de monofenois ligados a glicosídeos, de forma que as características aromáticas atribuídas a estes compostos fenólicos aumentam após o processo fermentativo, quando as leveduras consomem os açúcares atrelados aos precursores e formam os monofenois livres (STERCKX et al., 2012). Para esta mesma classe de compostos fenólicos oriundos da madeira, a liberação de moléculas de monofenois ocorre pelo processo de degradação térmica durante o processo de estocagem da madeira em pátios antes da fabricação dos barris, quando ocorre a interação do meio ambiente e de microrganismos nativos da madeira na degradação da lignina (CANTWELL ; BOUCKAERT, 2016), e também intensamente durante o processo de tosta do interior dos barris, correspondente à reação de degradação térmica (STERCKX et al., 2012).

A contribuição de compostos fenólicos para o perfil aromático de bebidas alcoólicas envelhecidas tem sido elucidada por diversas pesquisas (POISSON; SCHIEBERLE, 2008; STERCKX et al., 2012; BORTOLETTO; ALCARDE, 2015). Alguns monofenois podem ser considerados aromas indesejáveis (*off-flavours*) em alguns tipos de cervejas, em vinhos, uísques e *sherrys*, como o 4-vinil guaiacol (4VG) e o 4-vinil fenol (4VF) (VANBENEDEN et al., 2008). Estes compostos, quando presentes em grande quantidade em cervejas de baixa fermentação, podem ocasionar aromas indesejáveis descritos como "medicinal" ou "fenólico" (THURSTON; TUBB, 1981). Porém, além de acrescentar complexidade à composição aromática de bebidas, estes mesmos compostos são responsáveis por caracterizar estilos de cerveja como as cervejas belga e alemã de trigo (WACKERBAUER; KRAMER, 1982a; VANBENEDEN et al., 2008).

Os dois compostos acima citados apresentam vias similares de formação, de forma que o 4VG é derivado da descarboxilação do ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) e o 4VF deriva da descarboxilação do ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), e estas reações podem ocorrer tanto por degradação térmica durante o

processo de fabricação da cerveja (WACKERBAUER e KRAMER, 1982b) ou via descarboxilação enzimática realizada por cepas de levedura de alta fermentação (CLAUSEN et al., 1994).

Cervejas que têm em sua composição maior quantidade de maltes escuros apresentam naturalmente maior teor dos compostos 4VG e 4VF pois, durante a produção destes maltes, o processo de torra contribui com aporte de energia, responsável por favorecer a degradação térmica dos ácidos fenólicos precursores destes compostos. O processo de descarboxilação enzimática, por sua vez, depende da tolerância da cepa de leveduras a ácidos orgânicos. O ácido ferúlico é um forte inibidor do metabolismo fermentativo alcoólico, enquanto outros ácidos, como o siríngico que é derivado da degradação da lignina, não apresentam toxicidade à levedura (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Os compostos etil-fenólicos são originados a partir da reação enzimática da vinil-fenol redutase, dada por leveduras do gênero *Brettanomyces* que podem se desenvolver em cervejas envelhecidas em barris de madeira. A partir desta via de biotransformação, os compostos vinil-fenólicos (4VG e 4VF) passam a 4-etil-guaiacol e 4-etil-fenol, respectivamente, e estas duas novas moléculas podem trazer características de aromas considerados defeitos no vinho (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003). No atual cenário cervejeiro, o emprego de leveduras do gênero *Brettanomyces* sob forma de cultura isolada em processo fermentativo tem se tornado comum com o objetivo de reproduzir características de cervejas de diferentes estilos (BJCP, 2015) ou então aumentar a complexidade aromática de produtos, em vista à contribuição deste gênero com aromas "medicinal" e "defumado" (SÚAREZ et al., 2007).

Leveduras selvagens do gênero *Brettanomyces* também apresentam aparato enzimático para biotransformação de ácidos hidroxicinâmicos em vinil-fenóis, porém esta é apenas uma via intermediária (CALLEJO; GONZALEZ; MORATA, 2017) antes de serem produzidos os etil-fenóis.

2.5.3.3. Furfural e 5-hidroximetilfurfural

Além de compostos fenólicos que atribuem características indesejadas à cerveja, outra classe destes compostos denominados aldeídos fenólicos são desejáveis e caracterizam aromas de bebida envelhecida por estarem altamente relacionados à madeira e ao processo de fabricação de barris. O furfural pode ser originado a partir da degradação térmica de pentoses (NACHENIUS et al., 2013), sejam estes açúcares oriundos da madeira ou de matérias primas empregadas na fabricação da bebida. Cervejas que apresentam maior carga de maltes torrados sob altas temperaturas naturalmente contêm maior concentração de furfural (COGHE et al., 2004).

Durante a etapa de fermentação da cerveja, o furfural contido no mosto, advindo do malte torrado ou originado durante a etapa de fervura do mosto, sofre uma redução enzimática e é transformado em álcool furfurílico (VANDERHAEGEN et al., 2004a). Durante a guarda da cerveja engarrafada, o álcool furfurílico sofre uma reação de condensação, catalisada pelo baixo pH da bebida (próximo de 4,4), resultante no éter furfuril-etílico (EFE). Este éter já havia sido relatado em vinhos doces fortificados, bem como sua importância para a caracterização do envelhecimento desta bebida (CUTZACH; CHATONNET; DUBOURDIEU, 1999).

O composto heterociclo da classe dos furanos de maior importância quantitativa na cerveja envelhecida é o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Este composto é originado durante o processo de maltagem ou durante o processo de fervura, pois sua formação é dada pela reação de Maillard. Esta reação, quando envolve uma hexose, é responsável por originar o 5-HMF, e quando parte de uma pentose, o furfural é formado (VANDERHAEGEN et

al., 2006). Estas moléculas são intermediários da reação de Maillard na formação dos compostos de coloração marrom, as melanoidinas.

2.5.3.4. Éter Furfuril-Etílico (EFE)

O 5-(etoximetil)-2-furfural ou éter furfuril-etílico (EFE) é um composto que foi recentemente relacionado ao envelhecimento de cervejas devido ao seu aumento durante este processo. Este composto foi associado a descritores como "madeira" e "vinho do porto" e seu limiar de percepção foi estimado em 6 $\mu g \cdot L^{-1}$ (VANDERHAEGEN et al., 2004b). Sua via de formação é dada redução enzimática do furfural pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e é transformado em álcool furfurílico (VANDERHAEGEN et al., 2004a). Durante a guarda da cerveja engarrafada, o álcool furfurílico sofre uma reação de condensação, catalisada pelo baixo pH da bebida, resultante no EFE (Figura 3).

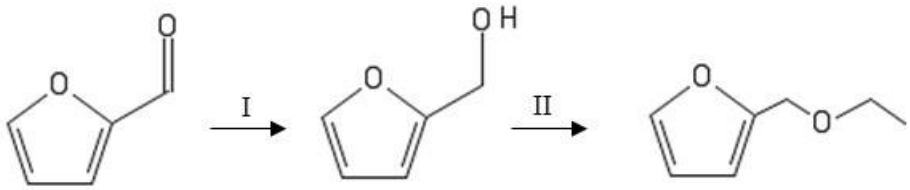


Figura 3. Via simplificada de formação do éter furfuril etílico (EFE) a partir do furfural. I – bioredução (*S. cerevisiae*); II – reação com etanol.

Em cervejas com alto teor alcoólico (acima de 8 % $v \cdot v^{-1}$) e de coloração mais escura (acima de 50 EBC), o intermediário na reação de formação do EFE, o álcool furfurílico, encontra-se presente em maior concentração quando comparado às cervejas mais leves. A combinação entre alto teor de etanol e de álcool furfurílico torna a cerveja mais sensível à formação do EFE. Este éter já havia sido relatado em vinhos doces fortificados, bem como sua importância para a caracterização do envelhecimento desta bebida (CUTZACH; CHATONNET; DUBOURDIEU, 1999). Quando este composto marcador de envelhecimento de cervejas excede consideravelmente seu limiar de percepção, a matriz pode apresentar característica de aroma de solvente (VANDERHAEGEN et al., 2007).

2.5.3.5. Sotolon

O composto 4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona, também chamado "sotolon" é um típico heterociclo presente em vinhos do Porto é formado durante o envelhecimento desta bebida em barris de madeira e está frequentemente associado aos descritores "madeira", "rançoso", "queimado", "frutas secas", "condimentado" e "*Tawny*" (FERREIRA; BARBE; BERTRAND, 2003). As possíveis vias de formação deste composto em cervejas envelhecidas em garrafa foram propostas por Scholtes, Nizet e Collin (2015), dentre as quais há a reação de

condensação entre o acetaldeído, produzido pela oxidação do etanol durante armazenamento, e o ácido α-ceto-butírico, vindo da condensação de duas moléculas de acetaldeído sob ambiente oxidativo ou da desaminação de treonina (CANTARELLI, 1967; TAKAHASHI; TADENUMA; SATO, 1976). Outra provável via de formação do sotolon na cerveja é descrita pela condensação entre o ácido hidroxiacético (formado a partir da degradação Strecker pela levedura a partir da serina) e acetoína (derivada da redução do diacetil pela levedura), sendo esta última via descrita a que apresentou maior concentração da furanona (SCHOLTES; NIZET; COLLIN, 2015).

2.5.3.6. β-damascenona

A β-damascenona (8-*E*-megastigma-3,5,8-trien-7-one) é um composto derivado de um carotenoide, também associado à estabilidade de aroma da cerveja (CHEVANCE et al., 2002). O desenvolvimento deste composto é dado em diversas matrizes vegetais envelhecidas, incluindo lúpulo (TRESSL et al., 1978). Uma via de formação da β-damascenona envolve a conversão de poliois derivados da transformação enzimática do carotenoide neoxantina (ISOE; KATSUMARA; SAKAN, 1973). Os poliois precursores normalmente são acumulados como complexos glicosídicos que podem ser liberados em solução em condições ácidas (OSORIO; DUQUE; FUJIMOTO, 1999).

As condições de pH da cerveja garantem que a liberação de β-damascenona aumento durante o envelhecimento da cerveja engarrafada (CHEVANCE et al., 2002; GIJS et al., 2002). Os descritores empregado para definição do aroma da β-damascenona, cujo limiar de percepção entre 0,2 e 0,9 $ng \cdot g^{-1}$ em água (BUTTERY et al., 1990), para cerveja correspondem a "frutas vermelhas", "morango", e em cervejas velhas foi detectada uma concentração deste composto equivalente a 9 $\mu g \cdot L^{-1}$, teor três vezes superior ao quantificado em cervejas frescas (GIJS et al., 2002).

2.6. Análise Sensorial

O desenvolvimento de novas metodologias para análise sensorial é decorrente da necessidade de otimizar o processo de obtenção de dados que permitam caracterizar um ou mais produtos sob a perspectiva de caracterização descritiva, quantitativa ou comparativa por semelhanças e diferenças. Pesquisas com bebidas contribuíram para desenvolvimento e otimização de várias técnicas de análise sensorial (PIGGOT, 2012).

Análises baseadas em mapas perceptuais são metodologias de importância crescente em áreas de desenvolvimento e otimização de bebidas alcoólicas (MCGREW; CHAMBERS, 2012). Um mapa de percepção é definido como "uma representação gráfica que captura a relação existente entre um grupo de produtos" (LAWLESS; HEYMANN, 1998), e que permite, portanto, a observação do efeito de introdução de um processo na modificação do produto.

A vantagem do uso do mapa de percepção consiste na forma como um produto é avaliado comparativamente ao outro. Em uma análise descritiva convencional, a comparação entre os produtos é realizada após o tratamento de dados, ao passo que, em uma tarefa de mapeamento, cada provador confronta todo o conjunto de amostras ao mesmo tempo, o que permite que a descrição de cada amostra ocorra de forma singular e também em comparação com as demais apresentadas (MURRAY; DELAHUNTY; BAXTER, 2001).

Para este tipo de análise sensorial, paineis que contam com menor número de provadores são permitidos caso pressupostos sejam atendidos. A seleção dos provadores depende de sua familiaridade com o produto (deve ser um usuário), e estes devem apresentar habilidade para avaliação de aspectos visual, olfativo e gustatório, para distinção dos gostos básicos doce, salgado, amargo, ácido e umami, capacidade de distinção entre aromas relevantes para diferentes amostras do produto (CAMPO et al., 2010; BIASOTO et al., 2010).

Uma vez que o número de provadores é reduzido, a análise pode envolver o confronto replicado entre um provador e uma mesma amostra (MONTELEONE, 2012). O número de réplicas pode variar entre 2 e 4 de acordo com o nível de diferenciação entre as características de cada amostra e o quanto se deseja detectar destas diferenças. Quanto mais marcantes as diferenças entre amostras, menos réplicas são necessárias.

O *Napping*, ou Mapeamento Projetivo, corresponde a um tipo de mapa de percepção cuja origem remete a pesquisas de mercado (PAGÈS, 2005). Nesta metodologia, amostras são posicionadas por provadores em uma folha em branco, de forma que amostras mais semelhantes entre si são posicionadas mais próximas e amostras mais distintas, mais distantes entre si (PAGÈS, 2005). Além da diferenciação espacial obtida pela análise, é possível aplicar o *Ultraflash Profile*, que corresponde à adição de componentes que descrevem características das amostras, ou grupos de amostras, após realizada sua disposição espacial pelo provador (DELHOLM et al., 2012; VARELA; ARES, 2012). Dessa forma, por meio de análise dos dados a partir de abordagem multivariada, é possível entender quais atributos levaram à diferenciação ou aproximação das amostras, bem como uma possível maneira de aproveitar bem o conhecimento de um painel treinado (PERRIN et al., 2008).

Ares e Varela (2014) recomendam o uso de mapeamento projetivo como uma abordagem holística para o entendimento de diferentes produtos. A preferência por um painel de avaliadores treinados ou semi treinados é justificada pelo nível de dificuldade da tarefa a ser desempenhada durante esta análise, a respeito do número de amostras e à atividade de agrupamento e reagrupamento livres.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O projeto foi conduzido no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.2. Preparo e envelhecimento da cerveja

A cerveja foi produzida na microcervejaria da ESALQ/USP. Inicialmente 40 kg de grãos de cevada maltada (tipo *Pilsen*), 3,2 kg de malte especial tipo *Special B* e 0,8 kg de malte especial tipo Melano foram moídos em moedor de rolos para cereais, e em seguida o *grist* (mistura de grão moídos) passaram pelo processo de mosturação por infusão em 100 L de água, com pH ajustado para 5,4 por meio da adição de ácido lático, para que ao final fosse obtido um mosto com alta densidade (24 °Plato ou 1,101 $g \cdot cm^{-3}$ de extrato original, determinado em refratômetro digital). A mosturação por infusão foi realizada a partir da mistura dos maltes moídos em volume de água mantido a 63,0 ± 0,5 °C durante 60 minutos e em seguida a temperatura foi elevada à taxa de 1 $°C \cdot min.^{-1}$ até 72,0 ± 0,5 °C permanecendo por 15 minutos. Após a sacarificação ter ocorrido, ocorreu a elevação da temperatura para 76,0 ± 0,5 °C permanecendo por 5 minutos como preparação para iniciar o processo de clarificação. Em seguida, o líquido foi filtrado à pressão atmosférica usando o próprio bagaço como elemento filtrante. Foi realizada a lavagem do bagaço com quantidade apropriada de água a 76,0 ± 0,5 °C dividida em duas porções até atingir o extrato de 21 °Plato (1,087 $g \cdot cm^{-3}$). Após isso, o mosto foi fervido durante 60 minutos. No início da fervura foram adicionados 143 g do lúpulo de amargor da variedade Target (10,8 % de alfa ácidos). Após o término da fervura, enquanto o mosto estava ainda em alta temperatura, foram adicionados 2,5 kg de açúcar cristal e em seguida foi realizado o vórtice (*Whirlpool*) seguido de repouso durante 30 minutos para a decantação de partículas no fundo da tina. O mosto foi resfriado até atingir a temperatura de inoculação de 21,7 °C e transferido para o fermentador de fundo cônico de capacidade para 200 L. Ao final, foram obtidos aproximadamente 85 L de mosto a 24,5 °Plato (1,103 $g \cdot cm^{-3}$), ao qual foram adicionados 105 g de leveduras da cepa US-05 (Safale - Fermentis).

A fermentação foi conduzida a 23,5 ± 0,5 °C durante 3 dias e em seguida até a atenuação máxima sob temperatura controlada de a 22,0 ± 0,5 °C. A fermentação foi conduzida até a atenuação máxima e atingiu densidade 3,5 °Plato (1,015 $g \cdot cm^{-3}$), e atingiu teor alcoólico de 12,1 % de etanol ($v \cdot v^{-1}$) a 20 °C. Após a finalização da fermentação, a maturação da cerveja foi conduzida durante 4 semanas a 7 ± 0,5 °C em fermentador de fundo cônico e purgas diárias de fermento foram realizadas para eliminar leveduras floculadas e *trub* (borra) frio.

Após a maturação, duplicatas de barris novos (Figura 4) de três diferentes espécies: Amburana (*Amburana cearensis*), Cabreúva (*Mycrocarpus frondosus*) e Carvalho Americano (*Quercus alba*), com volumes medidos (Tabela 3), previamente tratados, foram preenchidos com a cerveja obtida. O tratamento dos barris consistiu em hidratação, ou seja, o preenchimento por completo com água clorada para estancar quaisquer vazamentos, seguido da sanitização mediante preenchimento com solução de ácido peracético 4 % e tempo de contato de 24 horas, aporte de vapor (99 °C) durante 15 minutos e finalmente introdução de álcool 70 % ($v \cdot v^{-1}$) via aspersão antecedendo imediatamente o preenchimento com a cerveja. Os tratamentos químico e térmico foram realizados em vista à estabilização biológica da madeira, de forma a eliminar ao máximo os microrganismos nativos da madeira, como leveduras selvagens,

bactérias láticas e bactérias acéticas (VAN OEVELEN; L'ESCAILLE; VERACHTERT, 1976; SPITAELS et al., 2014).

Figura 4. Barris novos de Carvalho Americano (*à esquerda*), Amburana (*ao centro*) e Cabreúva (*à direita*) empregados no envelhecimento da cerveja.

Tabela 3. Volumes, em litros (L), dos barris medidos por diferença entre massa de barril cheio de água e barril vazio.

Barril	Volume (L)
Amburana 1	11,35
Amburana 2	11,86
Cabreúva 1	12,06
Cabreúva 2	11,79
Carvalho americano 1	12,39
Carvalho americano 2	12,29

Os tonéis foram mantidos em câmara de envelhecimento sob temperatura controlada de 17,5± 1,0 ºC, onde permaneceram durante o período de envelhecimento de 6 meses. O teor de umidade foi obtido semanalmente por leitura de higrômetro digital e por meio do acompanhamento diário verificou-se que a umidade variou entre 78 e 85 %. As condições de temperatura e umidade permanecem dentro das recomendações propostas por Cantwell e Bouckaert (2016), com o intuito de conduzir um processo de envelhecimento com minimização de transformações microbiológicas que possa descaracterizar a cerveja elaborada.

Amostras das cervejas envelhecidas foram coletas mensalmente durante o período de envelhecimento e submetidas às análises de indicadores de qualidade em cerveja.

3.3. Indicadores de qualidade em cerveja

O pH foi medido em pHmetro digital (modelo DMPH-1 Digimed – Tecnal), por imersão direta do eletrodo nas amostras de cerveja desgaseificadas.

A análise da intensidade de cor foi efetuada mediante leitura de absorbância a 430 nm, com posterior conversão para cor EBC (EBC, 2000).

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria a 765 nm, após reação com o reagente de Folin-Ciocalteau (AMERINE; OUGH, 1980).

O amargor foi determinado por espectrofotometria a 275 nm seguindo o método EBC (2004), sendo a resposta obtida em EBUs (*European Bitterness Units* - Unidades de Amargor Europeia).

3.4. Análise cromatografia gasosa com detecção por ionização de chamas (GC-FID)

As amostras de cervejas foram previamente destiladas e então submetidas às análises de concentração de aldeído acético, acetato de etila, metanol, álcoois superiores (propanol, isobutanol, isoamílico) e ácido acético, mediante técnica por cromatografia gasosa em cromatógrafo Shimadzu modelo QP-2010 PLUS com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi nitrogênio (N_2), com fluxo de 1,2 mL·min.$^{-1}$. A temperatura do injetor foi 220 °C e a temperatura da coluna foi programada para 35 °C por 5 min, aumento até 220 °C a uma taxa de 4 °C·min.$^{-1}$, com retenção de 10 min a 220 °C. A temperatura do detector foi 220 °C (BORTOLETTO; ALCARDE, 2015).

3.5. Acompanhamento microbiológico

Análises microbiológicas foram realizadas meramente como acompanhamento do envelhecimento para atestar que as transformações da cerveja possam ser atreladas principalmente às vias físico-químicas ao longo do período de 6 meses em barris de diferentes madeiras. Amostras das cervejas foram retiradas 24 horas após o preenchimento dos barris (correspondente à amostra zero), 3 meses após o envelhecimento e após o período de 6 meses.

Amostras das cervejas dos diferentes barris foram retiradas e diluídas dez vezes. Em seguida, foram retirados 100 µL destas diluições para espalhamento em superfície de meios seletivos para contagem de organismos viáveis. Os meios MRS-ágar e Manitol-ágar foram empregados para contagem de bactérias láticas e bactérias acéticas, respectivamente. As placas do meio MRS-ágar foram incubadas em meio anaeróbico à 35 °C durante 72 horas, enquanto as placas Manitol-ágar foram incubadas também a 35 °C durante 72 horas, porém em meio aeróbico (ANGELONI, 2016). O meio WL Nutrient Medium (Difco) foi preparado seguindo as instruções da empresa fabricante e, após inoculação, incubado em condições aeróbicas, a 28 °C durante 72 horas para o desenvolvimento de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* (MEDINA et al., 2012). Foram consideradas aptas à contagem apenas as placas das diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

3.5.1. Meios de cultivo

A composição dos meios de cultivo que foram empregados seguem abaixo:

- MRS-ágar (Man, Rogosa & Sharpe (Merck, Darmstadt)); inibidor nistatina 100 mg·L^{-1} (Neo Química, Anápolis).

- Manitol-ágar: D-manitol 25 $g \cdot L^{-1}$ (Inlab, Brasil), extrato de levedura 5 $g \cdot L^{-1}$ (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), peptona 3 $g \cdot L^{-1}$ (Himedia, Mumbai, Índia), Agar 15 $g \cdot L^{-1}$ (Merck, Londres); inibidor nistatina 100 $mg \cdot L^{-1}$ (Neo Química, Anápolis).

- WL Nutrient Medium (Difco); inibidor cloranfenicol 100 $mg \cdot L^{-1}$ (Pfizer, Guarulhos).

3.6. Análise Sensorial

3.6.1. Provadores

O painel selecionado foi constituído de homens e mulheres (total 7 membros), de faixa etária entre 19 e 31 anos de idade, membros e pesquisadores do Laboratório de Qualidade Química de Bebidas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo. O critério de permissão de provadores foi apresentar idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos, com massa maior que 60 kg, não serem portadores de doenças crônicas, gestantes ou em estado de amamentação.

3.6.2. Treinamento do Painel

O treinamento foi constituído de três etapas visando à familiarização dos avaliadores com a matriz estudada (ARES; VARELA, 2014). Para realização do treinamento, os provadores confrontaram uma amostra referência correspondente à cerveja *Barleywine* não envelhecida, adicionada de materiais para realização dos testes a seguir descritos.

3.6.2.1. Gostos básicos

O teste de gostos básicos envolveu o uso de padrões de gostos básicos diluídos na matriz cerveja não envelhecida. A concentração de cada um dos padrões é descrita na Tabela 4. Nesta etapa, foram apresentadas amostras dos gostos básicos inclusive a amostra referência correspondente à cerveja não envelhecida, de forma a incentivar os avaliadores a perceberem a diferença na percepção de cada um dos gostos básicos levando em conta os interferentes da matriz.

Nesta etapa foram apresentados 4 mL de cada amostra (5 gostos básicos mais a amostra referência não envelhecida sem adição de padrão de gosto básico) aos provadores, e eles foram incentivados a consumir todo o volume das taças ISO de uma só vez. A sessão teve duração de 1 hora.

Tabela 4. Concentração de padrões de gostos básicos diluídos na cerveja Barleywine não envelhecida.

Gosto básico	Padrão utilizado	Concentração na matriz
Doce	Açúcar cristal	20 $g \cdot L^{-1}$
Salgado	Sal grosso	4 $g \cdot L^{-1}$
Ácido	Ácido cítrico	7 $g \cdot L^{-1}$
Amargo	Extrato de lúpulo BETABIO 45 (Hopsteiner)	312 $\mu L \cdot L^{-1}$
Umami	Sal Ajinomoto	2 $g \cdot L^{-1}$

3.6.2.2. Familiarização com as Madeiras Empregadas no Estudo

Na segunda etapa do treinamento, os avaliadores confrontaram amostras da cerveja não envelhecida adicionadas de extrato alcoólico obtido a partir de *chips* das madeiras estudadas no projeto: Amburana, Cabreúva e Carvalho americano.

Os extratos foram preparados a partir de chips e lascas das madeiras, partidos manualmente de pedaços maiores em novos pedaços de dimensão aproximada de 0,5 cm^2 e espessura de 0,2 cm. Os chips foram pesados separadamente em recipientes aos quais foram adicionados volumes iguais de Álcool Etílico P.A. (99,9 % LSChemicals) diluído com água destilada a 15 % ($v \cdot v^{-1}$), de forma a obter concentrações de 20 $g \cdot L^{-1}$ para cada infusão de madeira.

Os frascos recipientes com as diferentes madeiras e etanol diluído foram alocados em banho ultrassônico (Sppencer modelo USC-1400A), com aquecimento acionado, durante dois ciclos de 30 minutos. Após o tratamento com ultrassom, os frascos foram armazenados em estufa a 40 °C durante 72 horas. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel e a parte líquida armazenada em frascos separadamente. Os extratos foram diluídos na proporção 1:2 com cerveja não envelhecida.

Nesta etapa, foram apresentados 3 mL de cada uma das 3 amostras de extrato de madeiras, mais a amostra referência não envelhecida sem extrato de madeira. Os provadores receberam uma folha em branco e foram incentivados a anotar de forma livre os atributos para descrever aspectos olfativo, gustatório, sensações e retrogosto percebidos nas amostras. O levantamento livre de atributos baseou-se na técnica do *Free-Choice-Profiling* (FCP), que permite aos avaliadores desenvolverem seus próprios termos para descrição do produto (DELAHUNTY et al., 1997). Com base nestes resultados, foram selecionados aromas frequentemente citados para estabelecer referências que foram apresentadas ao painel na etapa seguinte. A duração desta sessão foi de 2 horas.

3.6.2.3. Apresentação de Referências

Na terceira etapa do treinamento, os avaliadores foram reunidos para confrontar referências (Apêndice B) de aromas e sensações levantados livremente na etapa anterior. Com o intuito de estabelecer padrões para aromas listados anteriormente, foram selecionados materiais representativos de atributos citados pelo painel, determinados pelo pesquisador responsável pela análise e levantados em estudos para avaliar bebidas alcoólicas (MEILGAARD; DALGLIESH; CLAPPERTON, 1979; MEILGAARD; REID; WYBORSKI, 1982; FERREIRA; LOPEZ; CACHO,

2000; ESCUDERO et al., 2007; CAMPO et al., 2010; PARKER, 2012; MONTELEONE, 2012; FLAVORACTIV LIMITED, 2015). A apresentação de grupos de aromas foi determinada com base na descrição de McGinley; McGinley (1998) com adaptações acreditadas pertinentes.

Durante esta etapa, os avaliadores foram incentivados a tomar nota em um caderno pessoal sobre a percepção dos estímulos gerados pelas referências, bem como a terminologia associada. Estas anotações foram permitidas também durante as duas sessões de análises. Antes de cada sessão, os avaliadores foram incentivados a confrontar as referências para ativação da memória sensorial. Durante as sessões, as referências foram mantidas em uma mesa ao lado dos avaliadores em caso de haver necessidade de consulta de alguma delas.

Para referência de coloração, os avaliadores confrontaram uma tabela de coloração de cerveja (escala EBC) com legendas em português para as diferentes tonalidades (Figura 5).

Figura 5. Material com escala de coloração legendada entregue aos provadores

MACRO DIVISÃO	SRM	TONALIDADE	EBC	CLASSIF.**
Palha	2 – 3		3,94 – 5,91	Cerveja Clara até 20 EBC
Amarelo	3 – 4		5,91 – 7,88	
Ouro	4 – 5		7,88 – 9,85	
Âmbar	6 – 9		11,82 – 17,73	
Profundo âmbar / cobre luz	10 – 14		19,70 – 27,58	Cerveja Escuro ≥ 20 EBC
Cobre	14 – 17		27,58 – 33,49	
Profundo cobre/castanho claro	17 – 18		33,49 – 35,46	
Castanho	19 – 22		37,43 – 43,34	
Castanho Escuro	22 – 30		43,34 – 59,10	
Castanho muito escuro	30 – 35		59,10 – 68,95	
Preto	35 +		68,95 – 78,80	
Preto opaco	40+		>78,80	

Fonte: Spiess (2016), adaptado de BJCP Guideline 2008

3.6.3. Amostras

A cerveja fermentada e maturada devidamente foi distribuída em barris de 10 L de Amburana (*Amburana cearensis*), Cabreúva (*Myrocarpus frondosus*) e Carvalho Americano (*Quercus alba*) para o processo de envelhecimento. Foram reservados 10 L da cerveja não envelhecida que foi armazenada refrigerada a 0 ºC durante o período de 6 meses com finalidade de estabelecer parâmetro comparativo para as análises sensoriais. As amostras obtidas a partir de duplicatas de cada madeira foram misturadas em proporções iguais para obter os três tratamentos designados Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano. Desta forma, as amostras relativas aos tratamentos das diferentes madeiras empregadas na análise sensorial correspondem a cervejas de concentração de compostos equivalentes aproximadamente às médias de cada um dos parâmetros analisados.

Os quatro tratamentos resultantes, correspondentes às cervejas não envelhecida e envelhecidas em barris de três espécies diferentes de madeiras, foram apresentados aos avaliadores. A apresentação de amostras de cervejas foi realizada segundo o delineamento Quadrado-Latino de Williams (WILLIAMS, 1949). Cada provador recebeu 20 mL de cada amostra em taças ISO 3591:1977 (taça transparente, lisa e composta por cristal com, no máximo, 9 % de chumbo abertura de 4,6 cm, parte mais convexa com 6,5 cm e altura de 15 cm), codificadas com números de três algarismos para a realização da primeira etapa da análise sensorial (Mapeamento projetivo ou *Napping*). Para a segunda etapa (*Ultraflash Profiling*), os provadores tiveram liberdade para determinar a ordem das amostras ao realizar a tarefa de caracterização destas.

3.6.4. Metodologias

As metodologias empregadas correspondem ao Mapeamento Projetivo (*Napping*) e à técnica *Ultraflash Profiling* (UFP) (PAGÈS, 2005; PERRIN et al., 2008). A análise consistiu no desenvolvimento de uma classificação das amostras pelos provadores treinados. Em uma folha A3 em branco (PAGÈS, 2005), os avaliadores agruparam espacialmente as amostras de forma que quanto maior a proximidade espacial, mais semelhantes entre si são as amostras, e mais distantes quanto mais diferentes as características delas. Em um momento seguinte, os provadores caracterizaram as amostras ou conjuntos de amostras empregando termos que foram desenvolvidos durante o treinamento (*Ultraflash Profiling*). Os termos compreenderam aspecto visual, aromas, gostos, sabores, sensações e retrogosto.

Para evitar fadiga e saturação dos avaliadores (KEMP; HOLLOWOOD; HORT, 2009) durante a etapa do UFP, os avaliadores foram incentivados a realizarem uma pausa de 10 minutos após realização da tarefa de caracterização de três amostras, que corresponde à metade durante esta etapa da análise. Os provadores passaram por duas sessões de cada uma das análises aplicadas (*Napping* e UFP). O termo de esclarecimento (Apêndice C) foi entregue aos provadores antecedendo a primeira sessão de análise. O projeto de análise sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da ESALQ/USP CAAE 81265417.0.0000.5395 (Anexo A).

3.7. Análise de dados

Os dados de análises físico-químicas foram submetidos ao método multivariado denominado Análise Fatorial Múltipla-AFM, uma vez que os dados representam grupos de variáveis de diferentes grandezas e unidades. A matriz de correlação de Pearson foi gerada com auxílio do pacote "corrplot" (WEI; SIMKO, 2017) para avaliar a relação existente entre as variáveis.

A análise univariada, que envolveu a comparação de médias dos resultados, foi realizada a partir de modelo de variância do tipo linear de efeito misto (BAUTISTA; QUARESMA; SANTANA, 2014) realizada sobre dados longitudinais.

$$y \sim \beta_{tempo} + \beta_{espécie} + b_{barril} + \varepsilon \quad (1)$$

O modelo de variância empregado para cada uma das variáveis analisadas(y), ou seja, concentrações de acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol, álcool isoamílico, soma de álcoois superiores, ácido acético, teor alcoólico, pH, coloração, amargor e fenólicos totais, envolveu os fatores fixos (β) "tempo de envelhecimento" e

"espécie de madeira", e "cada barril" como fator aleatório (b) visando ao efeito de singularidade de cada um dos barris de cada duplicata, uma vez que alterações podem existir entre barris de mesmo volume da mesma espécie de madeira. Além destes efeitos, o modelo conta com "erro" (ε) devido a modificações aleatórias desconhecidas.

Os dados obtidos pelo *Napping* correspondem a valores de coordenadas cartesianas em um eixo horizontal (x) e um eixo vertical (y), onde a origem da folha corresponde ao lado esquerdo inferior. Os valores de x e y obtidos para cada provador foram agrupados, de forma a obter número de grupos igual ao número de provadores, para realização de uma Análise Fatorial Múltipla - AFM (DEHLHOLM et al., 2012). Para obtenção de elipses de confiança foi empregado o método de *bootstrap* descrito por Lê e Husson (2008b), com emprego de painel virtual composto por número de simulações equivalente a 500, com nível de significância de 95 %.

Juntamente à tabela de dados de coordenadas, foi inserida um tabela de contingência, ou seja, uma tabela cujas colunas correspondem aos atributos citados pelos avaliadores para cada amostra, e o valor de cada um corresponde ao número de vezes que um dado atributo foi citado para uma dada amostra, o que corresponde a dados de frequência (DEHLHOLM et al., 2012). A tabela de contingência foi criada sobre os atributos cuja frequência mínima foram 5 % em relação à totalidade de atributos empregados na caracterização das amostras e que foram citados por, no mínimo, dois avaliadores distintos em cada uma das sessões. Os atributos selecionados para caracterização das amostras foram escolhidos segundo sua boa representatividade multidimensional nos eixos gerados pela AFM.

Foram empregados na análise de dados o software RStudio (R versão 3.4.3) e os pacotes FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008), SensoMineR (LÊ; HUSSON, 2008) e Rcmdr (FOX, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Acompanhamento microbiológico

Os resultados das análises microbiológicas de acompanhamento foram expressos em escala logarítmica a partir dos dados de médias das contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e representados na Figura 6.

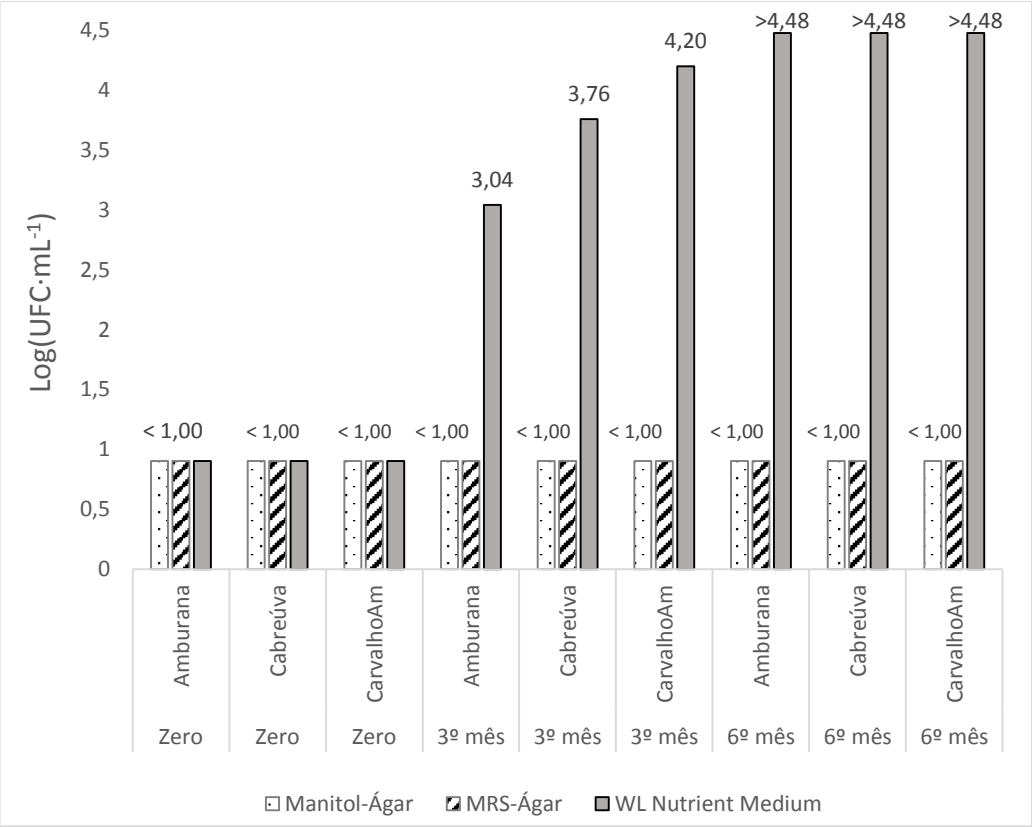


Figura 6. Resultados de contagem de UFC em diferentes meios de cultura adicionados de amostras de cervejas envelhecidas em barris de diferentes madeiras (Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano) expressos em logaritmo de contagem de UFC·mL^{-1}. Valores acima de 300 UFC·mL^{-1} expressos como > 4,48, e abaixo de 10 UFC·mL^{-1} expressos como < 1,00.

A partir dos dados de plaqueamento, foi possível verificar que há indícios de que o tratamento empregado para sanitização do barril foi eficiente para eliminar os microrganismos nativos das madeiras presente nos primeiros milímetros das aduelas onde a cerveja penetrou durante as primeiras 24 horas de envelhecimento, uma vez que não foi observado crescimento de microrganismos nos meios de cultivo. Não houve desenvolvimento de UFCs nos meios de cultura específicos para bactérias láticas (MRS-Ágar) e bactérias acéticas (Manitol-Ágar). Isto pode ser o indicativo de que o tratamento dos barris, bem como as condições de envelhecimento, principalmente a temperatura, e o tipo de cerveja escolhidos representam um ambiente pouco receptivo ao desenvolvimento destes microrganismos, que podem ser considerados contaminantes em cervejas (DAWOUD, 1987; OLIVER, 2012; WHITE, 2010). Houve, portanto, uma dominância de leveduras durante o processo de envelhecimento da cerveja

nas diferentes madeiras testadas, observado pela contagem apenas no meio WL-Nutrient Medium específico para leveduras (MEDINA et al., 2012).

Dentre os barris de madeiras brasileiras, que provavelmente foram construídos empregando-se madeira nunca antes utilizada para constituir um recipiente de envelhecimento de bebidas, os do tratamento Amburana apresentaram menor média de contagem de UFCs por mL de cerveja envelhecida até o 3º mês de envelhecimento. Este crescimento retardado pode ser compreendido por estudos realizados por Figueiredo et al. (2013) que mostraram o potencial antimicrobiano do extrato alcoólico da *Amburana cearensis*. Os taninos apresentam capacidade de precipitar proteínas superficiais de células impedindo o acesso da célula ou do microrganismo ao substrato, inibir a ação enzimática, romper a membrana plasmática (RODRIGUES et al., 2014).

Outro potencial fator que caracteriza a diferenciação no desenvolvimento de UFCs entre as madeiras testadas é a composição da resina. O aumento da resistência de árvores ao ataque de microrganismos foi atribuído à composição da resina variável entre diferentes espécies (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990). A durabilidade de madeiras cortadas tem sido relacionada à atividade antifúngica (ANDERSON; SCHEFFER, 1962; JURD; MANNERS, 1980; RUDMAN, 1962) e bactericida (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990) conferida por alguns compostos das resinas, como flavonas, flavononas, flavonóis, xantonas, chalconas e alcaloides (O'KENNEDY; THOMES, 1997; DJIPA; DELMÉE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; ESQUENAZI et al., 2002) observados em extrato alcoólico de *Amburana cearensis* por Figueredo et al. (2013).

Durante o período de envelhecimento da cerveja, o desenvolvimento de biofilme na superfície do líquido foi diferente em cada um dos tratamentos (Apêndice A). O comportamento de formação de biofilme aparentemente seguiu o comportamento da evolução do número de UFCs analisadas para os barris de diferentes madeiras.

4.2. Análises Físico-químicas

Seguem representados a seguir (Tabelas 5 e 6) os valores médios da composição volátil e físico química das cervejas analisadas ao longo do processo de envelhecimento em barris de diferentes madeiras.

Tabela 5. Comparação de médias dos resultados da análise de compostos voláteis (em mg·L^{-1}) das cervejas envelhecidas durante 6 meses em barris de madeiras de diferentes espécies (BW_0 – cerveja não envelhecida, Amb – Amburana, Cabr – Cabreúva, CarvAm – Carvalho Americano).

Trat.	Mês	Acetaldeído	Acetato de etila	1-propanol	Isobutanol	Álcool isoamílico	Soma de A.S.	Ácido acético
BW_0	-	10,6	5,5	40,8	24,9	66	131,7	125,9
Amb	1	7,7±0,46^{b}	5,8±0,11^{b}	33,8±0,39^{a}	20,7±0,32^{a}	45,9±1,60^{a}	100,4±2,31^{a}	124,9±8,91^{b}
Amb	2	8,8±1,46^{b}	5,0±0,35^{b}	33,8±1,06^{a}	20,4±0,50^{a}	44,3±2,40^{a}	98,6±3,96^{a}	127,2±5,62^{b}
Amb	3	17,8±7,16^{b}	6,3±0,00^{b}	38,0±1,25^{a}	22,9±0,64^{a}	55,6±2,11^{a}	116,5±4,00^{a}	147,9±13,80^{b}
Amb	4	15,6±0,30^{b}	4,1±0,14^{b}	27,4±3,21^{b}	16,3±2,12^{b}	27,1±9,87^{b}	70,9±15,21^{b}	137,4±2,27^{b}
Amb	5	60,9±15,77^{a}	7,9±0,05^{ab}	35,6±0,10^{a}	21,5±0,12^{a}	46,8±0,42^{a}	103,9±0,44^{a}	144,6±32,66^{b}
Amb	6	58,5±8,37^{a}	11,0±2,27^{a}	33,9±0,55^{a}	21,6±0,84^{a}	47,4±1,67^{a}	103,0±1,96^{a}	191,5±18,72^{a}
Cabr	1	8,5±0,04^{c}	4,6±0,29^{cd}	32,2±1,73^{b}	19,7±0,78^{b}	41,4±2,04^{b}	93,3±4,55^{b}	140,8±1,07^{b}
Cabr	2	12,3±1,99^{c}	4,0±0,12^{d}	32,9±1,33^{b}	19,2±0,98^{b}	39,6±4,25^{b}	91,7±6,56^{b}	135,7±7,98^{b}
Cabr	3	23,8±0,06^{b}	5,4±0,31^{c}	37,4±0,06^{a}	22,6±0,35^{a}	54,1±1,46^{a}	114,0±1,87^{a}	170,7±3,95^{a}
Cabr	4	44,7±1,01^{b}	5,5±0,29^{cd}	34,2±0,55^{ab}	20,8±0,38^{ab}	44,6±2,06^{b}	99,6±3,00^{b}	143,4±0,96^{b}
Cabr	5	53,4±18,36^{b}	6,6±0,35^{b}	33,8±0,37^{ab}	21,2±0,25^{ab}	45,3±0,52^{b}	100,3±1,15^{ab}	159,4±4,86^{a}
Cabr	6	89,6±17,32^{a}	10,7±0,85^{a}	32,1±1,12^{b}	20,8±0,58^{ab}	41,0±3,00^{b}	93,8±4,70^{b}	130,4±9,01^{b}
CarvAm	1	10,8±0,87^{b}	5,6±0,78^{a}	33,9±0,53^{a}	20,5±0,29^{c}	45,6±4,29^{b}	100,0±5,10^{b}	151,5±5,18^{b}
CarvAm	2	16,6±3,36^{b}	4,5±0,21^{a}	34,2±0,04^{a}	20,7±0,21^{c}	51,2±1,99^{b}	106,1±2,24^{b}	152,7±4,80^{b}
CarvAm	3	42,7±4,09^{b}	5,8±0,48^{a}	36,2±1,85^{a}	22,2±1,21^{bc}	59,0±4,61^{ab}	117,4±7,67^{ab}	189,1±15,86^{a}
CarvAm	4	125,3±20,39^{a}	6,2±1,04^{a}	34,2±0,54^{a}	21,5±0,49^{bc}	54,8±0,82^{b}	110,6±1,86^{b}	172,1±6,38^{ab}
CarvAm	5	92,7±36,66^{ab}	10,5±1,77^{a}	35,2±0,56^{a}	23,0±0,22^{b}	60,7±2,97^{ab}	118,9±3,76^{ab}	159,4±1,94^{b}
CarvAm	6	105,7±9,32^{a}	62,6±58,66^{a}	35,6±0,68^{a}	25,6±0,99^{a}	68,8±3,66^{a}	130,0±5,33^{a}	125,1±0,14^{c}

Soma A.S. – soma dos álcoois superiores.
Comparação de média entre os diferentes meses realizados dentro de cada uma das madeiras.

Tabela 6. Comparação de médias dos resultados das análises de teor alcoólico (% v·v^{-1}), pH, coloração (EBC), amargor (BU) e fenólicos totais (mg de ácido gálico ·L^{-1}) das cervejas envelhecidas durante 6 meses em barris de madeiras de diferentes espécies (BW_0 – cerveja não envelhecida, Amb – Amburana, Cabr – Cabreúva, CarvAm – Carvalho Americano).

Trat.	Mês	Teor alcoólico	pH	Coloração	Amargor	Fenólicos totais
BW_0	-	12,8	5,18	59,8	33,5	655,9
Amb	1	11,4± 0,06^{a}	4,92± 0,09^{a}	53,3± 2,20^{b}	62,8± 2,72^{c}	744,8± 6,65^{b}
Amb	2	11,0± 0,11^{ab}	4,73± 0,01^{a}	58,5± 4,60^{ab}	65,0± 3,87^{c}	741,0± 13,17^{b}
Amb	3	11,0± 0,01^{ab}	4,59± 0,02^{a}	54,7± 0,84^{b}	72,1± 3,30^{b}	733,7± 8,40^{b}
Amb	4	10,8± 0,03^{b}	4,67± 0,02^{a}	55,5± 0,00^{b}	73,4± 5,05^{b}	778,9± 24,67^{ab}
Amb	5	10,9± 0,02^{ab}	4,69± 0,02^{a}	63,1± 0,00^{a}	78± 5,85^{ab}	805,1± 24,05^{ab}
Amb	6	11,2± 0,34^{ab}	4,72± 0,03^{a}	58,8± 2,27^{ab}	80,9± 7,62^{a}	841,3± 48,45^{a}
Cabr	1	10,7± 0,42^{a}	4,74± 0,04^{ab}	56,9± 3,04^{b}	40,4± 2,30^{a}	750,8± 4,73^{b}
Cabr	2	10,8± 0,09^{a}	4,60± 0,04^{c}	65,3± 0,00^{ab}	41,3± 1,67^{a}	795,9± 23,04^{ab}
Cabr	3	10,6± 0,12^{a}	4,71± 0,02^{b}	63,1± 2,20^{b}	38,7± 3,70^{a}	752,2± 25,01^{b}
Cabr	4	10,4± 0,01^{a}	4,79± 0,04^{a}	67,5± 0,00^{a}	40,1± 0,35^{a}	847,0± 11,24^{a}
Cabr	5	10,4± 0,04^{a}	4,70± 0,09^{b}	71,2± 3,76^{a}	43,6± 0,65^{a}	880,3± 7,53^{a}
Cabr	6	10,1± 0,19^{a}	4,79± 0,04^{a}	73,4± 3,50^{a}	43,8± 1,85^{a}	910± 33,50^{a}
CarvAm	1	11,2± 0,13^{a}	4,85± 0,08^{a}	57,7± 2,20^{ab}	25,4± 0,92^{a}	639,9± 0,51^{c}
CarvAm	2	10,9± 0,04^{b}	4,58± 0,05^{b}	54,7± 0,84^{b}	23,1± 0,15^{ab}	640,4± 2,04^{c}
CarvAm	3	10,7± 0,08^{bc}	4,60± 0,01^{b}	53,9± 0,00^{b}	22,1± 0,10^{b}	640,9± 6,62^{bc}
CarvAm	4	10,5± 0,01^{c}	4,69± 0,00^{ab}	55,5± 0,00^{b}	22,0± 2,00^{b}	655,0± 8,45^{bc}
CarvAm	5	10,7± 0,01^{c}	4,68± 0,02^{ab}	57,5± 0,00^{ab}	23,4± 0,92^{ab}	699,6± 1,18^{a}
CarvAm	6	10,7± 0,70^{c}	4,66± 0,10^{ab}	59,4± 0,68^{a}	21,4± 0,80^{b}	660,3± 8,57^{b}

Comparação de média entre os diferentes meses realizados dentro de cada uma das madeiras.

4.2.1. Análise multivariada dos resultados físico-químicos

A análise multivariada do tipo Análise Fatorial Múltipla (AFM) foi aplicada sobre os dados de análises físico-químicas e cromatográficas visando ao entendimento do papel dos conjuntos de variáveis para a contribuição com a variância existente entre as amostras. A AFM foi escolhida pois existem grupos de variáveis medidas segundo diferentes metodologias: cromatografia, densimetria digital e colorimetria sob diferentes comprimentos de onda, e desta forma é possível realizar uma padronização do peso dos grupos de variáveis para caracterização multidimensional das amostras de cervejas envelhecidas. Em seguida, quando discriminados segundo abordagem multivariada, os parâmetros foram investigados individualmente para observação do comportamento de cada um deles ao longo do tempo e de acordo com a espécie de madeira utilizada na fabricação do barril para envelhecimento da cerveja.

Após realização da AFM, foram definidas dimensões multivariadas, das quais as três primeiras contêm informações que explicam 65 % da variância total entre as amostras (Figura 7). A primeira dimensão contém informação de 31 %, a segunda contém 21 % e a terceira 13 % da variância entre as amostras segundo os parâmetros estudados nas amostras de cervejas.

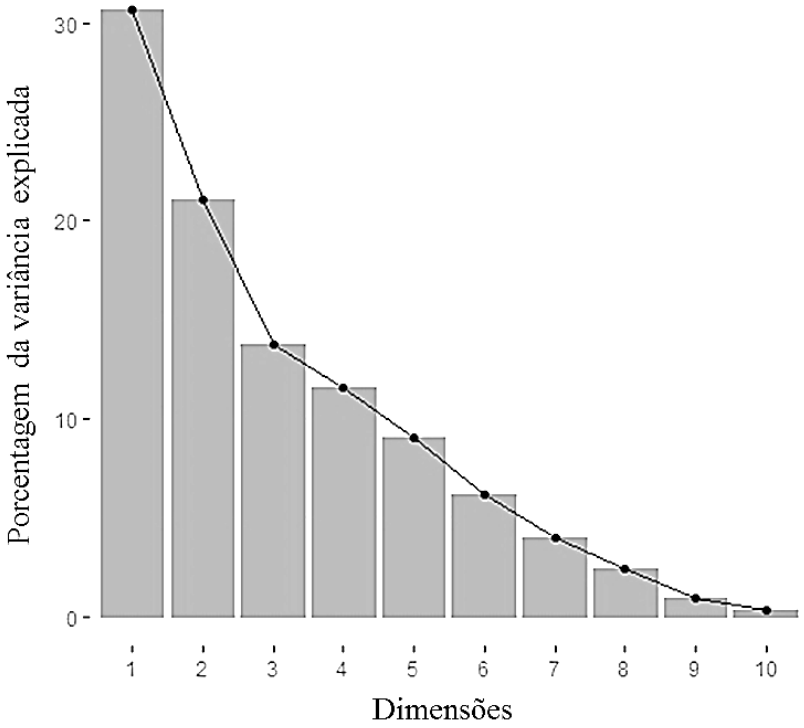


Figura 7. Valor de variância obtida para cada dimensão gerada pela AFM representada sob forma de gráfico do tipo *Scree plot*

O primeiro plano multidimensional foi explorado segundo a representação dos grupos de variáveis abordados na AFM (Figura 8) e a representação das amostras (Figura 9). Com o objetivo de avaliar a terceira dimensão gerada pela AFM, foi também realizada a representação dos grupos de variáveis abordados na AFM (Figura 10) e a representação das amostras (Figura 112).

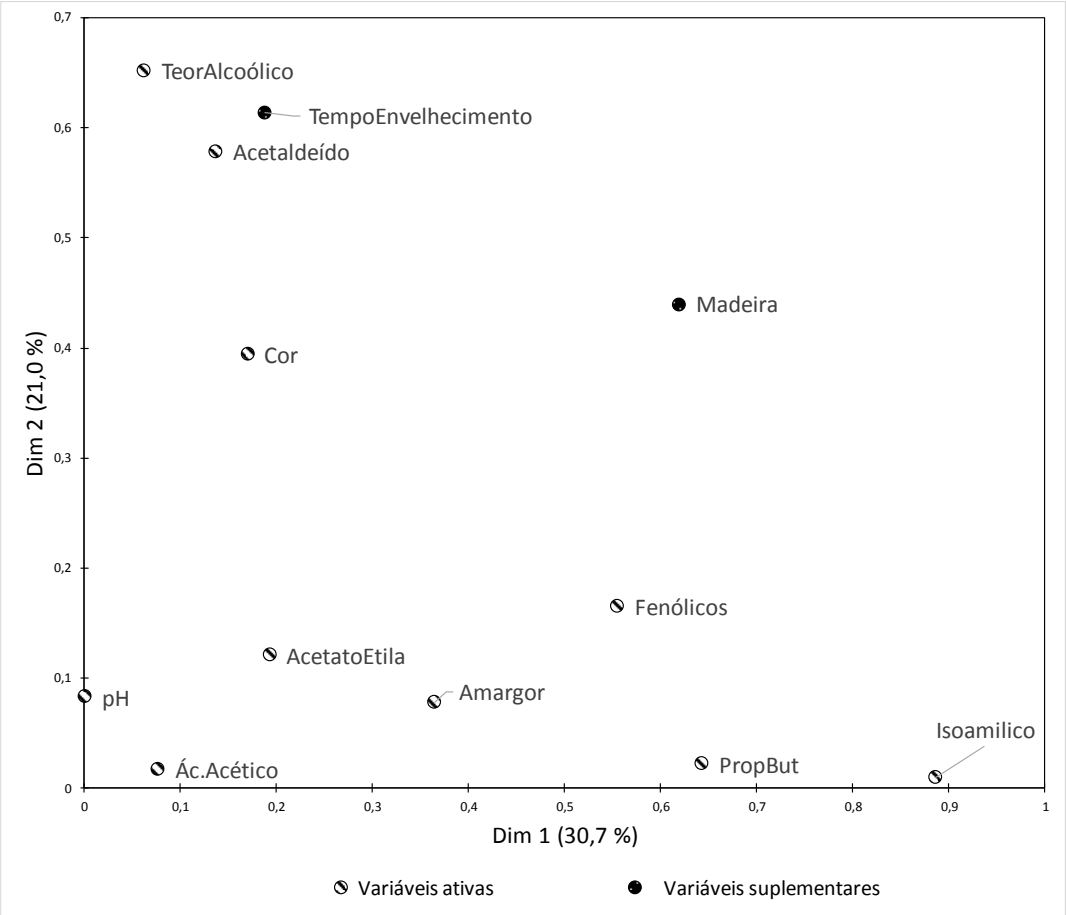


Figura 8. Representação dos grupos de variáveis nas duas primeiras dimensões geradas na AFM, com tempo de envelhecimento e tipos de madeiras representados como variáveis suplementares.

Foi possível observar que as variáveis mais bem representadas no eixo horizontal, correspondente à primeira dimensão fatorial (31 % da variância total), são as concentrações de álcoois superiores (isoamílico e conjunto de n-propanol e isobutanol) e concentração de compostos fenólicos. A projeção da variável suplementar que representa os tipos de madeira sobre o eixo horizontal ("Madeira" na Figura 8) indica que a variabilidade concentrada na primeira dimensão pode estar relacionada à espécie de madeira empregada na fabricação do barril, e esta pode estar relacionada à composição química representada pelos parâmetros acima listados.

Ao ser analisada a segunda dimensão (21 % da variância total entre as amostras), representada pelo eixo vertical, pode-se observar os grupos de variáveis bem relacionados a esta: teor alcoólico, concentração de acetaldeído e coloração. A variável suplementar representada pelo tempo de envelhecimento está relacionada também à segunda dimensão da AFM, o que indica que a variabilidade quanto ao teor alcoólico e à concentração de acetaldeído estão mais relacionadas à variação do tempo de envelhecimento. É possível atribuir às condições do ambiente de envelhecimento (temperatura e umidade) à variação quanto ao teor alcoólico (CALIXTA et al., 1979) da cerveja envelhecida, e atribuir ao tempo, de forma pouco dependente da espécie de madeira empregada para fabricação do barril, a evolução na concentração de acetaldeído possivelmente formado pela oxidação do etanol durante o processo de envelhecimento de bebidas alcoólicas (RAMIREZ-RAMIREZ, 2002; VANDERHAEGEN et al., 2006) ou pela

atividade microbiológica crescente ao longo do tempo de envelhecimento (GARCÍA-MAIQUEZ, 1988; MARTÍNEZ; PÉREZ; BENÍTEZ, 1997).

Ainda na análise do grupo de variáveis sobre a projeção na segunda dimensão da AFM, é possível observa que o parâmetro coloração está relacionado às duas primeiras dimensões, o que permite a associação deste parâmetro tanto ao período de tempo de envelhecimento, quanto ao tipo de madeira. Essa relação será investigada posteriormente ao tratar os parâmetros físico-químicos de maneira univariada.

Na Figura 9, estão representadas as amostras projetadas sobre as duas primeiras dimensões geradas pela AFM. É possível observar que as variáveis suplementares relativas a tempo de envelhecimento apresentam ordem crescente cronológica quanto maior os valores no eixo vertical, que representa a dimensão 2. A evolução do teor alcoólico durante o envelhecimento também é bem representada no eixo vertical, de forma que a amostra não envelhecida apresentou a média de teor alcoólico mais elevada e as amostras com maiores tempos de envelhecimento apresentaram médias menores de conteúdo alcoólico (Tabela 6 e Figura 10). O eixo horizontal, que representa a primeira dimensão, mostra as variáveis suplementares e a distribuição das amostras de cervejas envelhecidas em diferentes madeiras sob o aspecto multidimensional de análises físico-químicas. Foi observada a distinção entre as espécies de madeiras, de forma que as cervejas envelhecidas em madeiras brasileiras (Amburana e Cabreúva) apresentaram maior proximidade multivariada, enquanto a envelhecida Carvalho Americano mostrou-se diferente destas duas madeiras e próxima da cerveja Barleywine não envelhecida.

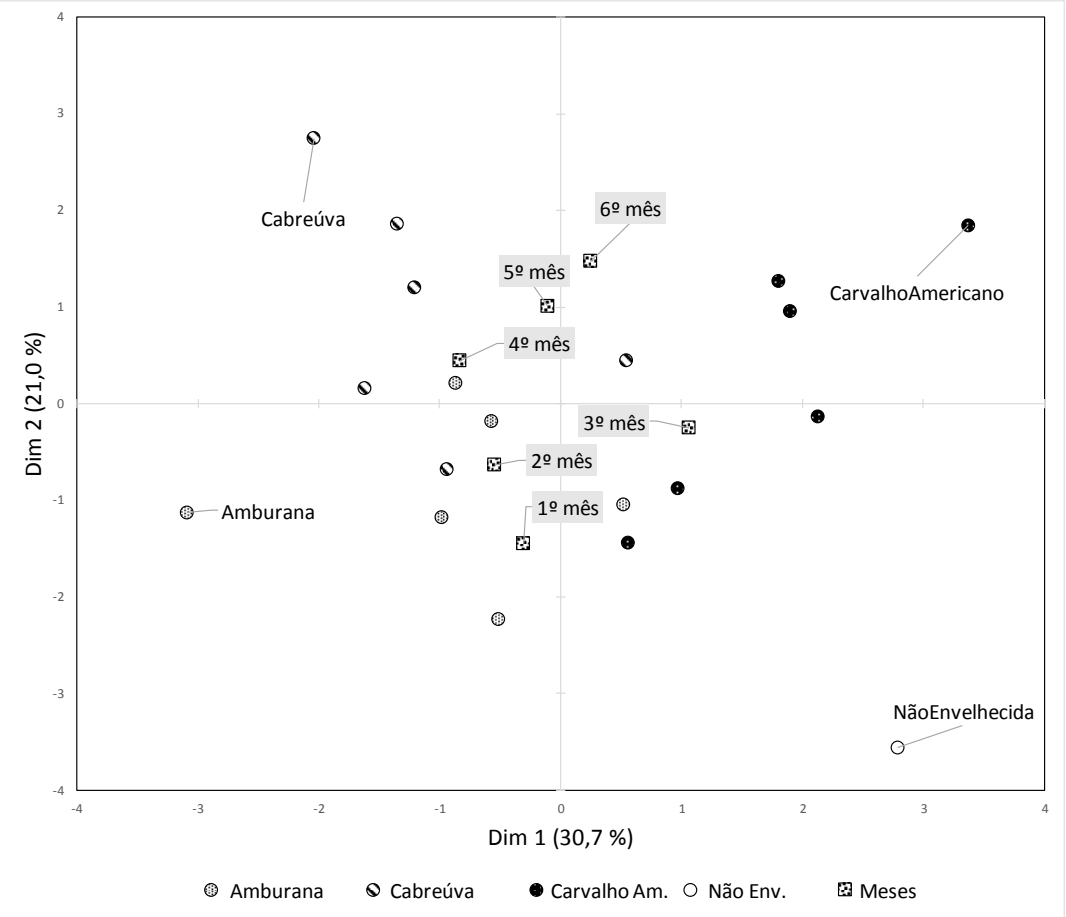


Figura 9. Representação das amostras de cervejas envelhecidas em diferentes madeiras nas duas primeiras dimensões geradas na AFM, com tempos de envelhecimento representados como variáveis suplementares.

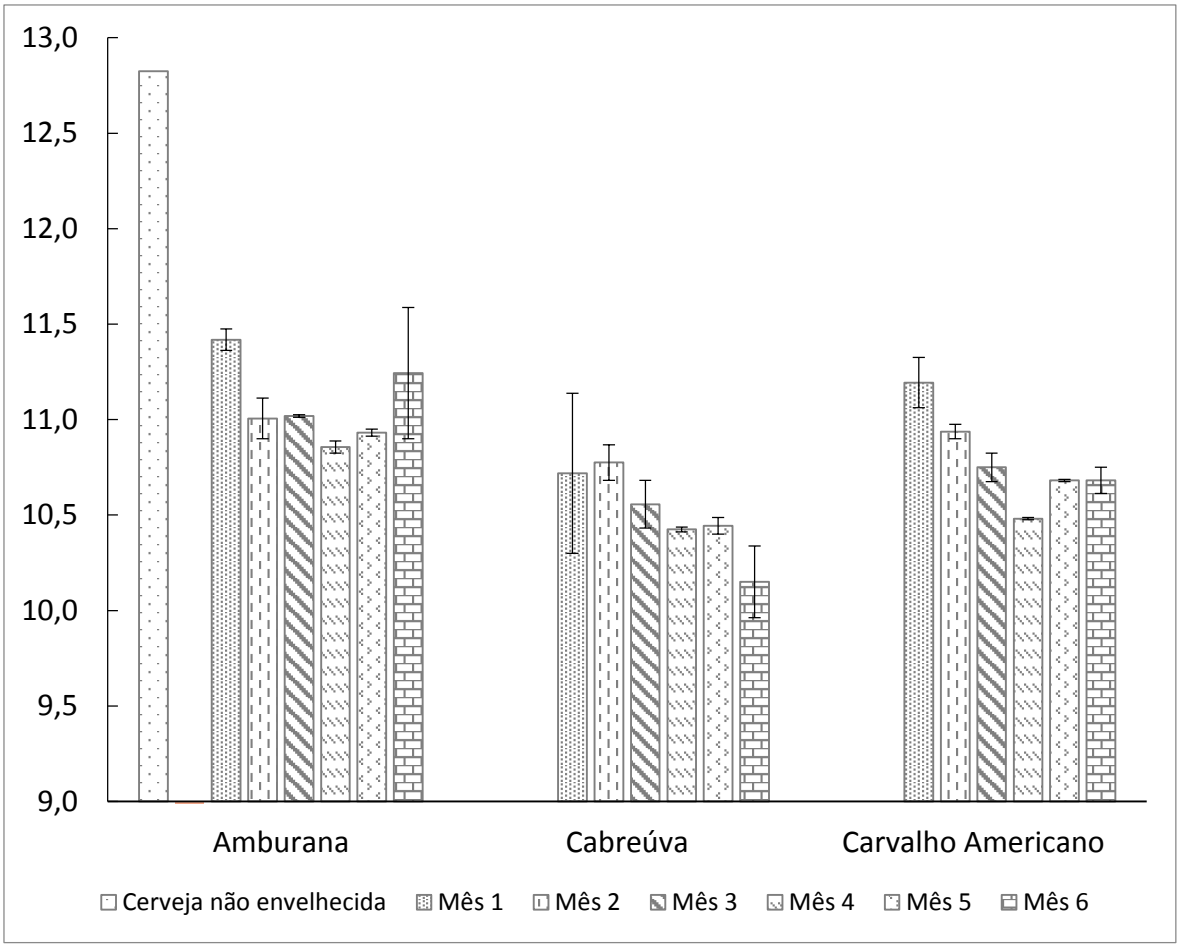


Figura 10. Evolução do teor alcoólico (% v·v^{-1}) da cerveja Barleywine envelhecida em barris de Amburana, Cabreúva, Carvalho Americano.

A proximidade entre as amostras envelhecidas em madeiras nacionais pode ser interpretada pela concentração de compostos fenólicos nas diferentes cervejas. Os compostos fenólicos totais estão relacionados à concentração de extrativos totais nas diferentes espécies de madeiras (MORI et al., 2003) e também no tipo de barril empregado. O barril fabricado com madeira de Carvalho Americano é constituído de aduelas oriundas de um barril de maior volume utilizado anteriormente, o que pode ser um indício da menor extração de compostos fenólicos pelo fato destes já terem sido solubilizados durante o envelhecimento de uma bebida anteriormente (PUECH, 1981; DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AYLOTT; MACKENZIE, 2010). Isto justificaria a maior aproximação da cerveja envelhecida em barris de Carvalho Americano em relação à amostra não envelhecida.

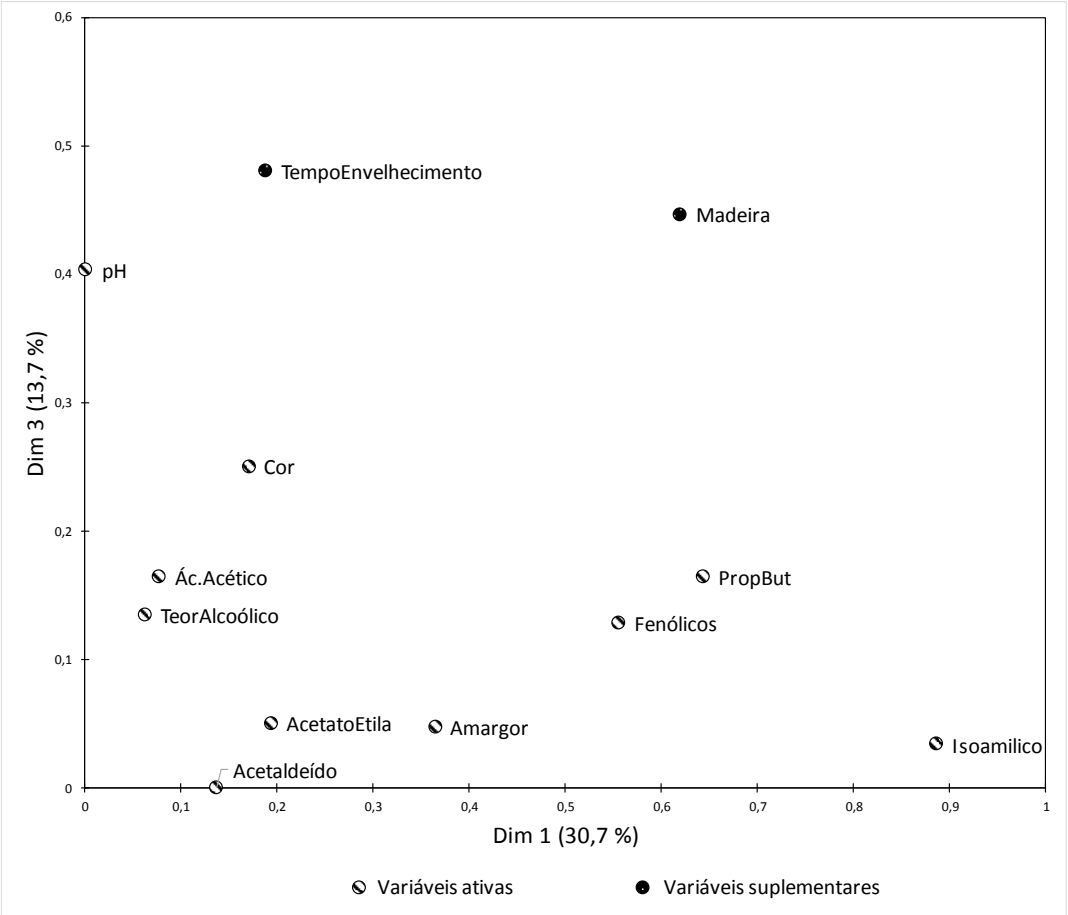


Figura 11. Representação dos grupos de variáveis na primeira e na terceira dimensões geradas na AFM, com tempo de envelhecimento e tipos de madeiras representados como variáveis suplementares.

Com finalidade de explorar outros parâmetros físico-químicos, foram representados na Figura acima os grupos de variáveis estudados em função das dimensões primeira e terceira (14 % da variância total entre as amostras). Neste novo plano gerado pela AFM, é possível observar que o pH passou a ser bem representado na terceira dimensão e está bastante relacionado a esta. Ao observar as variáveis suplementares referentes ao tipo de madeira e ao tempo de envelhecimento, é possível observar que ambas ajudam a caracterizar a variância descrita na dimensão 3, associada principalmente à leitura do pH.

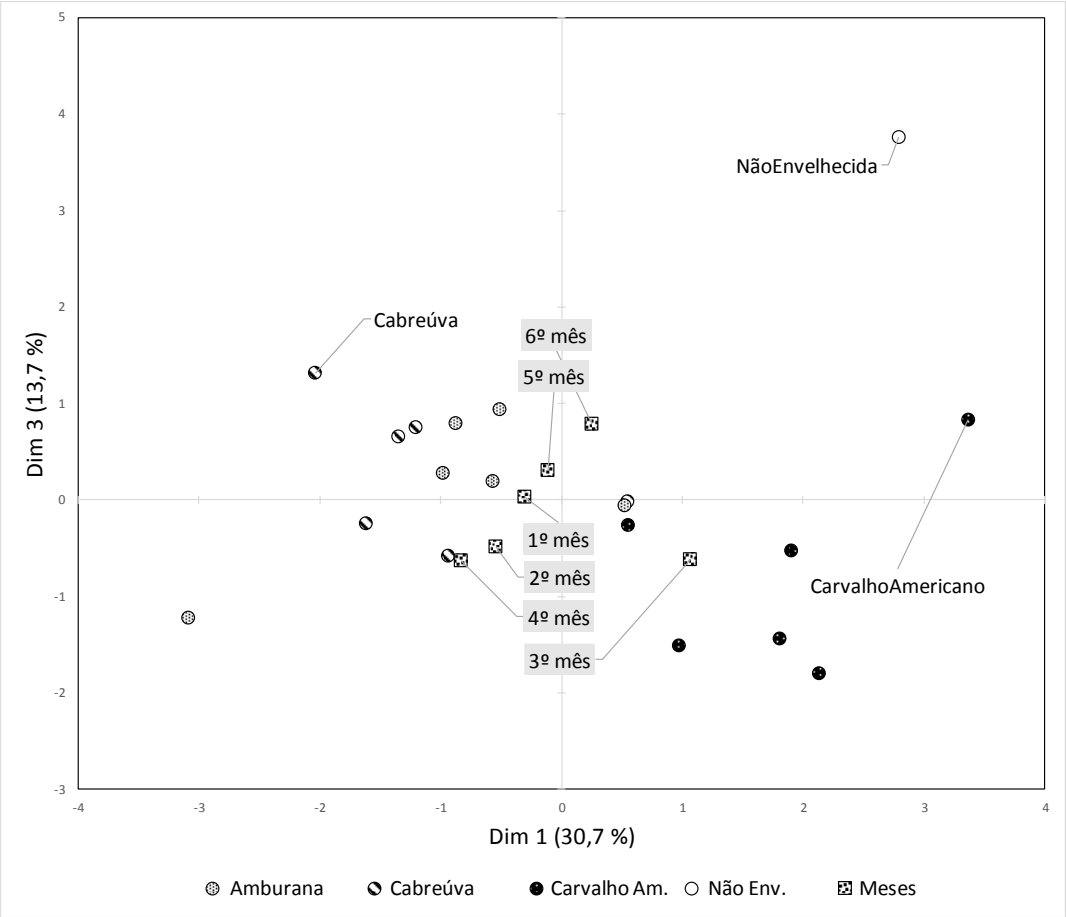


Figura 12. Representação das amostras de cervejas envelhecidas em diferentes madeiras na primeira e na terceira dimensões geradas pela AFM, com tempos de envelhecimento representados como variáveis suplementares.

Ao explorar a dimensão 3 gerada pela AFM, sob a representação das amostras de cervejas (Figura acima), é possível verificar a proximidade entre as madeiras brasileiras (Amburana e Cabreúva) em relação às cervejas não envelhecida e à envelhecida em barris de Carvalho Americano. Durante o envelhecimento, o pH das cervejas diminui em relação à cerveja base, de forma que as amostras de Carvalho Americano apresentaram comportamento diferente das demais madeiras no início do envelhecimento quanto ao parâmetro pH, e ao final do período de 6 meses no interior do barril, passou aproximar-se das amostras das demais madeiras.

Sob o aspecto investigativo da correlação entre os parâmetros físico-químicos estudados, uma matriz de correlação de Pearson foi construída para entender a relação existente entre estes (Figura 13).

	Tempo_envelhecimento	Teor_Alcoólico_.vol.	Acetaldeído	Acetato_Etila	N_propanol	Iso_butanol	Álcool_Isoamílico	Ácido_Acético	Soma_Alcoois_Superiores	Fenólicos_Totais	pH	Coloração	Amargor
Tempo_envelhecimento	1	-0.51	0.73	0.32	-0.11	0.22	0.11	0.21	0.09	0.44	-0.26	0.41	0.13
Teor_Alcoólico_.vol.	-0.51	1	-0.43	-0.04	0.36	0.21	0.21	-0.13	0.24	-0.36	0.37	-0.4	0.22
Acetaldeído	0.73	-0.43	1	0.36	0.09	0.41	0.4	0.23	0.36	0.03	-0.1	0.23	-0.3
Acetato_Etila	0.32	-0.04	0.36	1	0.13	0.46	0.4	-0.16	0.37	-0.15	-0.13	::	-0.16
N_propanol	-0.11	0.36	0.09	0.13	1	0.85	0.83	0.23	0.89	-0.32	0.17	-0.09	-0.22
Iso_butanol	0.22	0.21	0.41	0.46	0.85	1	0.95	0.12	0.97	-0.33	0.1	-0.02	-0.33
Álcool_Isoamílico	0.11	0.21	0.4	0.4	0.83	0.95	1	0.22	0.99	-0.54	0.03	-0.23	-0.48
Ácido_Acético	0.21	-0.13	0.23	-0.16	0.23	0.12	0.22	1	0.21	-0.1	-0.03	-0.19	-0.16
Soma_Alcoois_Superiores	0.09	0.24	0.36	0.37	0.89	0.97	0.99	0.21	1	-0.48	0.07	-0.18	-0.42
Fenólicos_Totais	0.44	-0.36	0.03	-0.15	-0.32	-0.33	-0.54	-0.1	-0.48	1	0.05	0.7	0.53
pH	-0.26	0.37	-0.1	-0.13	0.17	0.1	0.03	-0.03	0.07	0.05	1	0.1	0.03
Coloração	0.41	-0.4	0.23	::	-0.09	-0.02	-0.23	-0.19	-0.18	0.7	0.1	1	0.02
Amargor	0.13	0.22	-0.3	-0.16	-0.22	-0.33	-0.48	-0.16	-0.42	0.53	0.03	0.02	1

Figura 13. Matriz de correlação de Pearson realizada sobre os resultados obtidos a partir de leituras de quantificação dos parâmetros cromatográficos e físico-químicos.

Em relação ao tempo de envelhecimento, é possível observar sua correlação negativa com o teor alcoólico (% v·v^{-1}), o que é confirmado pela perda de volume de etanol durante os 6 meses de envelhecimento das amostras. Também apresenta correlações positivas com o teor de compostos fenólicos totais e também com a coloração (valores de correlação próximos de 0,40) que indica o aumento do valor destes parâmetros ao longo do processo de envelhecimento. A correlação do tempo com a concentração de acetaldeído é positiva e apresenta valor maior que 0,70, fato observado em estudos de envelhecimento de diferentes bebidas alcoólicas e justificado pela atividade de microrganismos, principalmente leveduras, responsáveis pela síntese deste aldeído (GARCÍA-MAIQUEZ, 1988; MARTÍNEZ; PÉREZ; BENÍTEZ, 1997), e pela via oxidativa de transformação do etanol. Esta cinética de transformação pode ser observada pela correlação negativa entre teor alcoólico e concentração do acetaldeído (Figura 13).

Foi observada a alta correlação entre os álcoois superiores (AS) n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico (maior que 0,80). Dentre os AS, podem-se destacar as correlações positivas, maiores que 0,40, entre o isobutanol e o isoamílico versus as concentrações de acetaldeído e acetato de etila.

A correlação entre os AS, principalmente isoamílico, e o teor de compostos fenólicos e a medida de amargor é negativa e próxima de - 0,50. Isto pode ser justificado pela via de formação de álcoois superiores por

leveduras selvagens e bactérias segundo via metabólica de aminoácidos durante a fase de crescimento celular (HAZELWOOD et al., 2008) ser influenciada pela presença de alto teor de extrativos nas madeiras (MORI et al., 2003). Os maiores níveis de álcool isoamílico e, consecutivamente, soma de álcoois superiores (Tabela 5), foram observados para o tratamento Carvalho Americano, cujas concentrações observadas de compostos fenólicos e medida de amargor foram as mais baixas dentre os tratamentos.

O efeito de resinas e compostos fenólicos extraídos das madeiras sobre microrganismos é explicado por reações entre estes compostos e proteínas receptoras na superfície da membrana celular (RUDMAN, 1962; FIGUEREDO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). O bloqueio destas proteínas receptoras pode inviabilizar mecanismos celulares regulatórios, essenciais para o desenvolvimento e crescimento destes microrganismos (RODRIGUES et al., 2014).

As correlações existentes entre o teor de compostos fenólicos totais e as medidas de coloração, expressa em EBC, (EBC, 2000) e amargor, expressa em EBU (EBC, 2004) são positivas e da ordem de 0,70 e 0,53, respectivamente. Esta correlação é explicada pela composição fenólica das cervejas envelhecidas, dependente da espécie de madeira empregada na fabricação do barril. A coloração adquirida durante o processo de envelhecimento, principalmente no tratamento em barris de Cabreúva (Tabela 6), pode estar relacionada a complexos antociânicos formados por compostos fenólicos hidrossolúveis, como a flavanol-etil-antocianina (GARDNER; MCGUINNESS, 1977; CILLIERS; SINGLETON, 1990), que se originam durante a senescência vegetal de espécies arbóreas a partir da degradação do amido constituinte da reserva energética de células parenquimáticas (LEÃO, 2006). A presença deste tipo de complexo hidrossolúvel de coloração pode estar relacionada tanto à espécie de madeira quanto às técnicas de tanoaria brasileiras que ignoram o processo de maturação da madeira (*seasoning*, em inglês), que pode eliminar e degradar compostos fenólicos de alto peso molecular (CILLIERS; SINGLETON, 1990).

A medida de amargor também está correlacionada positivamente com a concentração fenólica das amostras, porém a correlação entre as medidas de amargor e coloração são aproximadamente nulas (da ordem de 0,02, Figura 13). Este fato pode ser explicado pelo comportamento semelhante entre as observações das medidas de amargor e compostos fenólicos, ou seja, ambas aumentam ao longo do período de envelhecimento, porém as classes de compostos que conferem aumento na coloração das cervejas e no amargor são distintas. Esta distinção é explicada pela metodologia de quantificação, que envolve solvente apolar no caso da análise de teor de amargor (EBC, 2004), enquanto a análise de coloração envolve o uso direto da amostra.

A extração por solvente apolar e leitura espectrofotométrica, que foram desenvolvidas para quantificação de substâncias amargas do lúpulo (EBC, 2004; ALDERTON et al., 1954), porém estes procedimentos analíticos não possuem alta especificidade para compostos de amargor do lúpulo (BUCKEE, 1985), o que gera um efeito residual na leitura sob espectrofotômetro ao somar outros compostos que contêm estrutura hidrofóbica e são, portanto, também extraídos pelo solvente apolar empregado.

No caso do lúpulo, a estrutura de cadeia lateral hidrofóbica de α-ácidos humulona e lupulona, cohumulona e colupulona, e adhumulona e adlupulona é oriunda dos aminoácidos hidrofóbicos leucina, valina e isoleucina, respectivamente (KEUKELEIRE, 2000). Já na resina da madeira, podem ser observados compostos apolares como ácidos graxos de cadeia longa, terpenos, ácidos resinosos, lignanas e fenólicos apolares (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990). A correlação entre tempo de envelhecimento e quantificação da medida de amargor nas amostras depende da espécie de madeira, de forma que barris de Amburana apresentam maior contribuição para este parâmetro que as demais madeiras, e o Carvalho Americano apresenta os valores mais baixos (Tabela 5).

4.2.2. Análise univariada dos compostos voláteis

A partir de dados de médias de leituras obtidas sobre os diferentes aspectos físico químicos da composição das cervejas envelhecidas nos diferentes barris, foi realizada a análise univariada (Tabelas 5 e 6) com comparação de médias e a seguir serão apresentados gráficos sobre estes parâmetros.

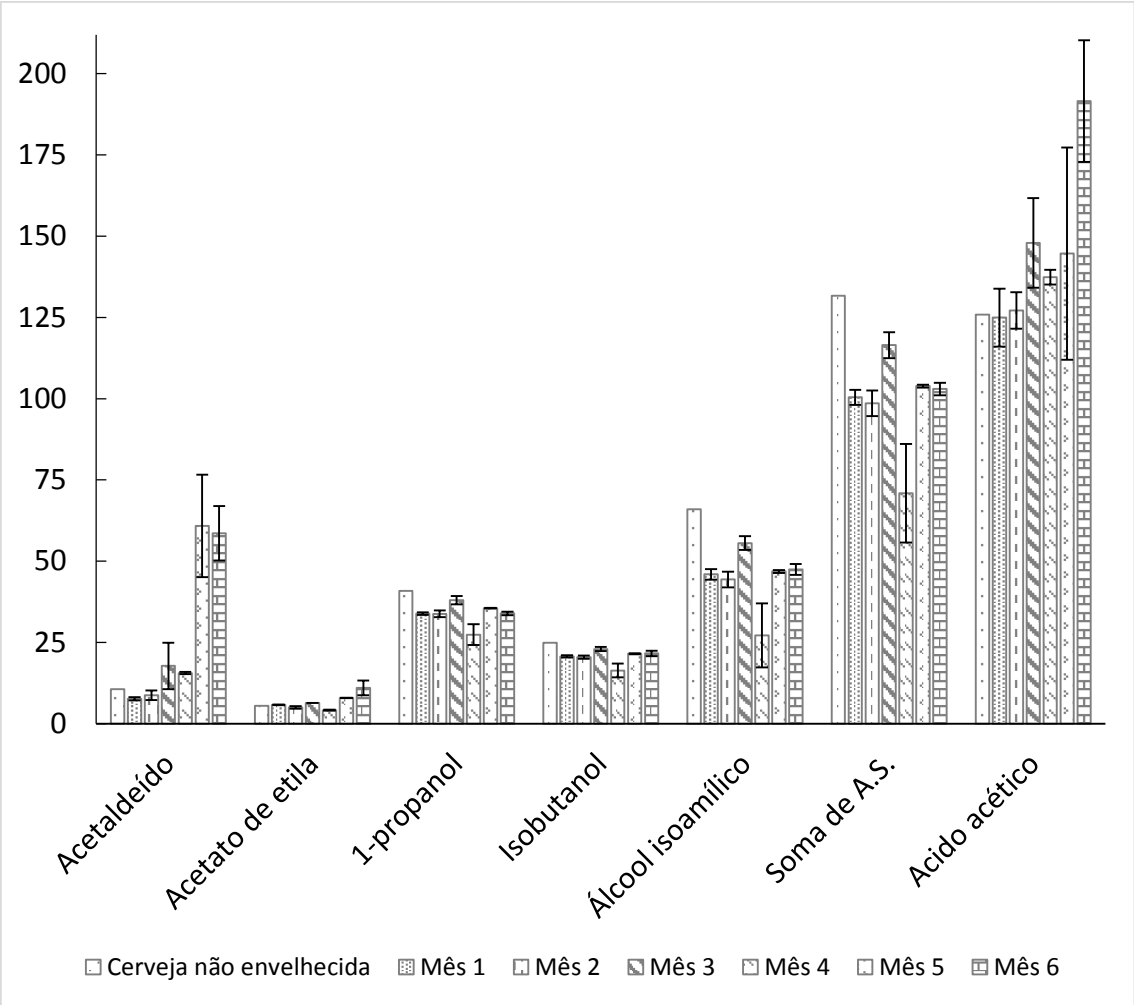


Figura 14. Evolução da composição volátil média (mg·L^{-1}) da cerveja Barleywine envelhecida em barris de Amburana.

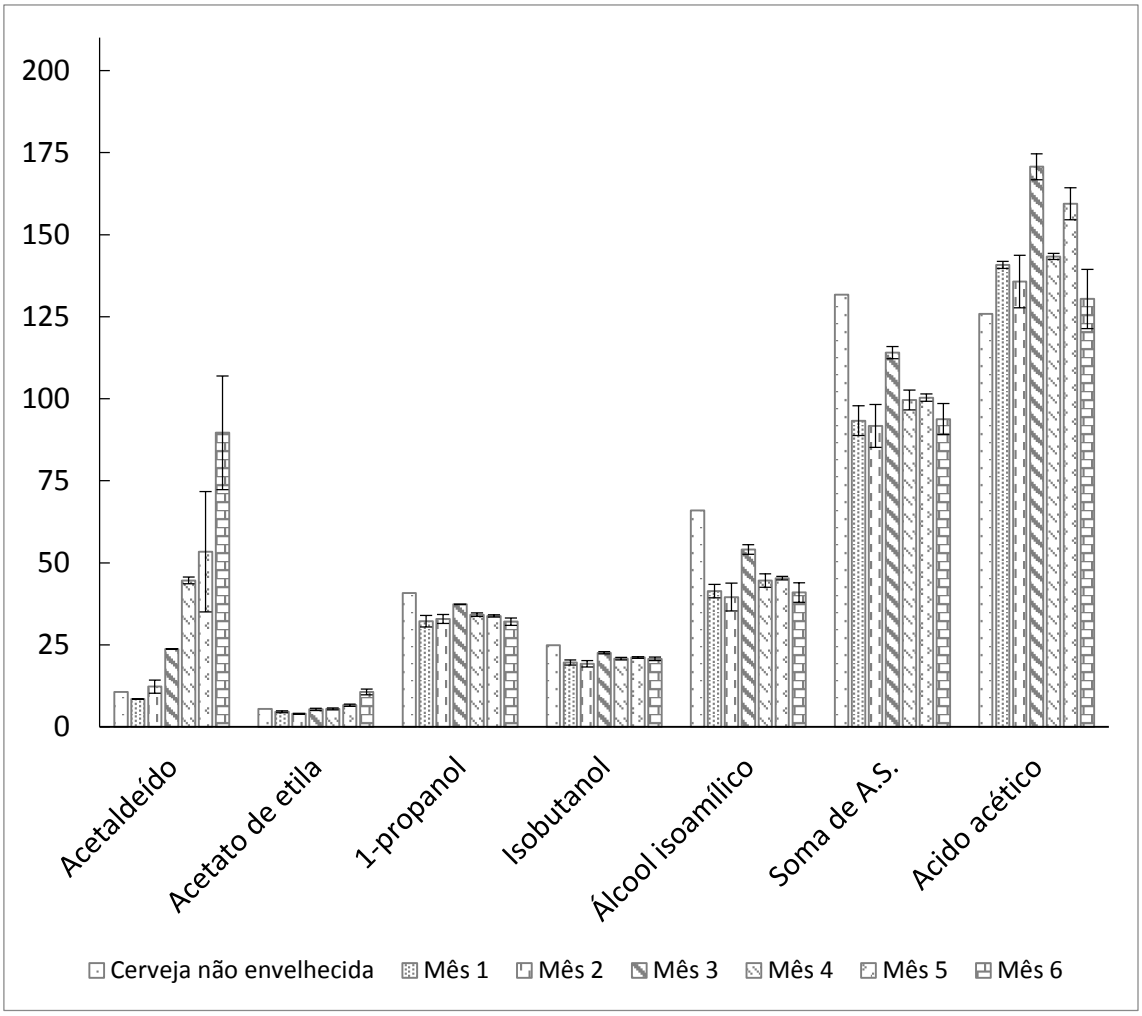


Figura 15. Evolução da composição volátil média (mg·L^{-1}) da cerveja Barleywine envelhecida em barris de Cabreúva.

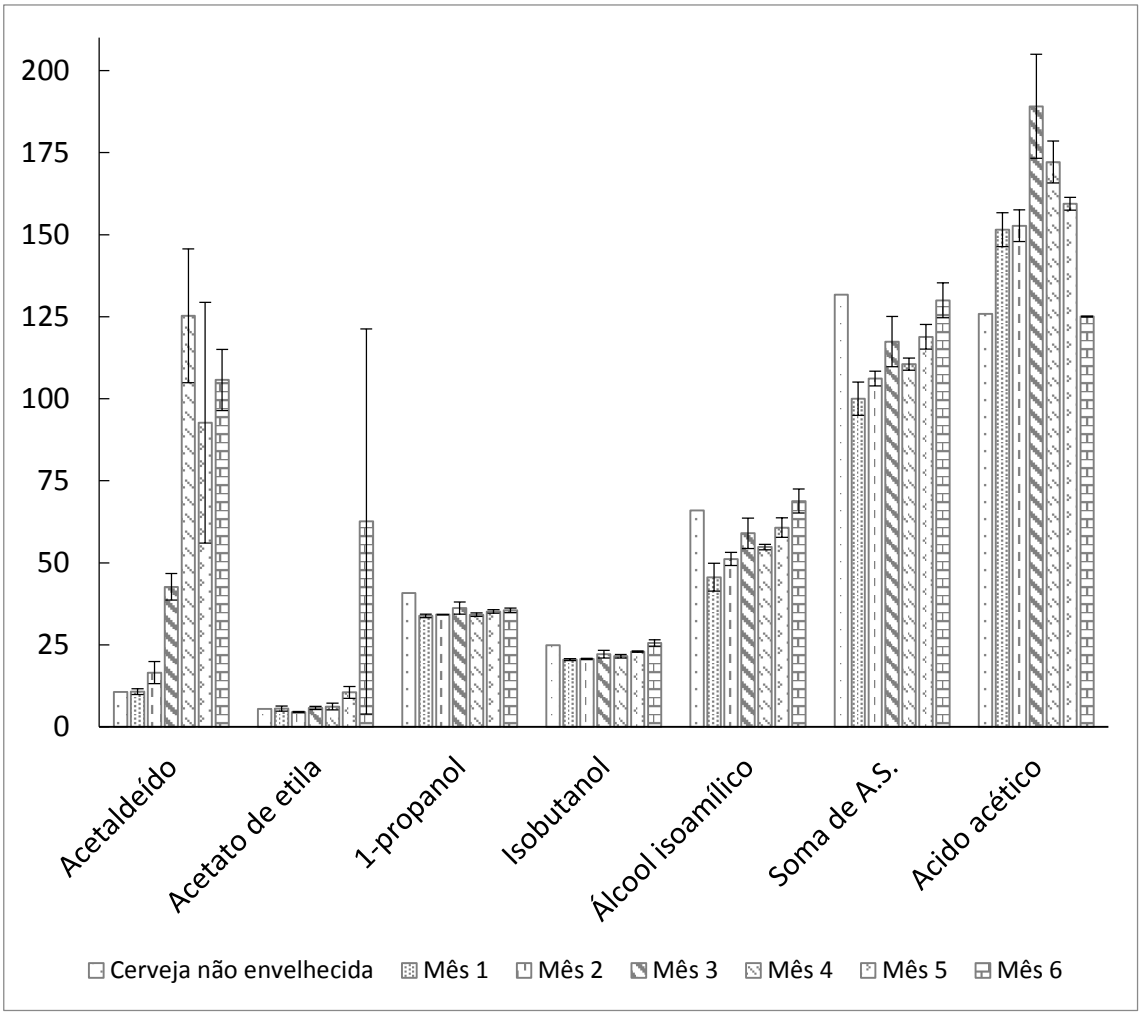


Figura 16. Evolução da composição volátil média (mg·L^{-1}) da cerveja Barleywine envelhecida em barris de Carvalho Americano.

4.2.2.1. Acetaldeído

As concentrações de aldeído acético nas amostras de cervejas aumentaram durante o período de envelhecimento (Tabela 5). Ao início, a cerveja Barleywine não envelhecida continha 10,7 mg·L^{-1}, teor próximo do limiar de percepção entre 10 e 20 mg·L^{-1} descrito por Meilgaard (1975). Até o 2º mês de envelhecimento, os diferentes tratamento apresentavam concentrações próximas abaixo dos 20 mg·L^{-1}. A partir do 3º mês de envelhecimento, foi possível observar diferenciação da cerveja envelhecida em Carvalho Americano (Figura 16), que atingiu o dobro da concentração do limiar de percepção, e alcançou a concentração máxima de 125 mg·L^{-1} ao 4º mês.

Em experimento realizado por Vanderhaegen et al. (2004a), o desenvolvimento da concentração de acetaldeído em cervejas maturadas em garrafas na presença de ar atmosférico atingiu praticamente o dobro da concentração original após 6 meses. A principal via de formação deste composto consiste na oxidação do álcool etílico (ANDERSEN; SKIBSTED, 1998, VANDERHAEGEN et al., 2006). O mesmo efeito sobre o aldeído acético foi observado por também por Saison et al. (2010) em cervejas maturadas em garrafa, onde a concentração passou de 6 para 24 mg·L^{-1} durante o período de 1 ano a 20 °C. O mesmo estudo mostrou a capacidade da levedura cervejeira de evitar a oxidação, de forma que o tratamento representado pela mesma cerveja armazenada em mesmas condições

de tempo e temperatura, porém na presença de células de *S, cerevisiae* desenvolveu concentração de acetaldeído equivalente a 11 mg·L^{-1}.

4.2.2.2. Acetato de Etila

A concentração de acetato de etila nas cervejas dos diferentes tratamentos manteve-se muito próxima do início do processo de envelhecimento até a observação no 5º mês. Durante este período, a concentração deste éster manteve-se abaixo (entre 4,0 e 10,5 mg·L^{-1}) do limiar de percepção equivalente a 21 mg·L^{-1} (MOLL et al., 1994). Já na medição equivalente a um período de envelhecimento de 6 meses, os tratamentos Amburana e Cabreúva apresentaram aumento significativo (Tabela 5). A média de maior valor foi observada para o tratamento Carvalho Americano (Figura 16), na leitura após 6 meses de envelhecimento, e atingiu 62,6 mg·L^{-1}, valor praticamente três vezes superior ao limiar de percepção. Porém esta leitura apresentou alto valor de desvio padrão, o que representa a diferença de leitura observada entre as duas repetições de barris de Carvalho Americano. É possível presumir pela análise de comparação de médias (Tabela 5), que a partir do modelo de variância empregado, a variação em apenas um dos barris desta madeira não representa uma evolução atribuída aos fatores fixos, mas sim à aleatoriedade do barril.

Este resultado refletiu diretamente no perfil sensorial da amostra de Carvalho Americano (Figura 26), na qual foi apontado o aroma de "acetato de etila" na caracterização desta amostra segundo resultados pelas metodologias de Mapeamento Projetivo (*Napping*) e UFP (*Ultraflash profile*).

Angeloni (2016) observou comportamento similar da concentração de acetato de etila em amostra de cerveja envelhecida em barris de carvalho: até o terceiro mês de envelhecimento, o nível deste éster se manteve em 47 mg·L^{-1}, já acima do limiar de percepção (MOLL et al., 1994), porém a medida no quinto mês a concentração atingiu 105 mg·L^{-1}. O autor atribuiu este aumento à ação metabólica de leveduras selvagens do gênero *Brettanomyces*, responsáveis pela formação de ácido acético (AGUILAR USCANGA; DE LIA; STREHAIANO, 2003) que reage com etanol para formação do acetato de etila. Este fator pode explicar o comportamento da formação deste éster no tratamento Carvalho Americano deste projeto

4.2.2.3. Álcoois Superiores

As concentrações de álcoois superiores nas amostras de cervejas ao longo do processo de envelhecimento (Tabela 5) foram próximas de valores observados por Boulton e Quain (2006) para diferentes tipos de cervejas, entre 100 e 200 mg·L^{-1}, o que indica conformidade com resultados normais e não relaciona necessariamente o envelhecimento em barris de diferentes madeiras ao aumento destes compostos voláteis. Foi observado um aumento da concentração de álcoois n-propanol, isobutanol e isoamílico ao longo do processo de envelhecimento, o que pode estar associado aos resultados de análises de acompanhamento microbiológico (Figura 6).

Segundo observações de Hazelwood et al. (2008), é possível a relação entre concentração de álcoois superiores e crescimento celular, uma vez que estes compostos são gerados pelo metabolismo de aminoácidos com função de regular o potencial redox da célula por meio da recuperação do NADH a partir de NAD+ (QUAIN; DUFFIELD, 1985), que é reaproveitado na via glicolítica (KRUGER, 1998). O álcool isoamílico, por exemplo, é originado a partir do metabolismo da isoleucina.

Em estudo sobre envelhecimento de cerveja em barris de carvalho, Angeloni (2016) reportou a relação direta entre o aumento do teor de ésteres e álcoois superiores e o desenvolvimento de leveduras selvagens do gênero *Brettanomyces*. Ao longo de um período de envelhecimento de 5 meses sob temperatura acima de 20 °C, o autor quantificou soma de álcoois superiores passando de 165 $mg \cdot L^{-1}$ inicialmente para 227 $mg \cdot L^{-1}$.

Neste projeto, a concentração de álcoois superiores passou de 132 na cerveja não envelhecida e atingiu médias de 103, 94 e 130 $mg \cdot L^{-1}$ respectivamente para os tratamentos Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano, o que pode estar associado às condições de envelhecimento e tipo de cerveja mais resistentes à influência do metabolismo de leveduras selvagens e microrganismos contaminantes. Incialmente, até o 1º mês de envelhecimento, foi observada a diminuição da concentração de todos álcoois superiores (n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico), que condiz com resultados observados em vinho tinto envelhecido em barris (ESPITIA-LÓPEZ et al., 2018).

Hashimoto (1972) realizou estudos de transformação de álcoois superiores em cervejas durante maturação em garrafa e constatou a via de formação de aldeídos a partir da exposição ao oxigênio. A transferência de elétrons vindos de álcoois superiores ocorre direcionada a grupos de carbonilas reativas de melanoidinas (VANDERHAEGEN et al., 2006), que são compostos de Maillard vindos do processo de secagem do malte (KUNZE, 2004).

A cerveja envelhecida em barril de Carvalho americano apresentou maior média na concentração de álcool isoamílico, e consecutivamente ao teor de álcoois superiores (Tabela 5), uma vez que o isoamílico corresponde entre 50 e 70 % de todos os álcoois superiores da cerveja (MEILGAARD, 1975) em relação às cervejas envelhecidas nas demais madeiras. A contagem de UFCs também foi maior no tratamento Carvalho Americano aos 3 meses de envelhecimento, fato associado aos valores de álcool superior e que são provavelmente justificados pelo tipo de madeira empregada na fabricação do barril. Foi verificada junto ao fornecedor dos toneis que a construção do barril de Carvalho Americano emprega madeira que constituiu outros barris anteriormente, ou seja, são barris remanufaturados.

Por ter sido empregado no envelhecimento de diferentes bebidas anteriormente, sem haver rastreamento exato dos processos anteriores, é possível que este recipiente contenha uma carga microbiológica maior. Além disso, a sobrevivência de leveduras selvagens, mais especificamente do gênero *Brettanomyces*, contaminante bastante comum em cervejarias (WHITE, 2010), podem sobrevier em barris vazios por serem capazes de degradar a celulose em açucares do tipo celobiose (SHIMWEL, 1947; RAMIAH, 1970), o que garante a manutenção de populações por disponibilidade de substrato. Essa população de leveduras pode ter contribuído para o aumento do teor de álcoois superiores ao longo do período de envelhecimento, logo após o decréscimo inicial gerado provavelmente pelo ambiente oxidativo.

4.2.2.4. Ácido Acético

A evolução da concentração de ácido acético, correspondente à acidez volátil, ocorreu de forma similar para todos os tratamentos investigados (Figuras 14 a 16). Inicialmente a Barleywine apresentava teor de ácido acético equivalente a 126 $mg \cdot L^{-1}$, valor que se adequa em constatações de Meilgaard (1975), Saison et al. (2008) e Saison et al. (2009) que apontam para teores normais em diferentes estilos de cervejas comerciais entre 30 e 300 $mg \cdot L^{-1}$, e acima do limiar de percepção de 120 $mg \cdot L^{-1}$ (MEILGAARD, 1975).

Ao 3º mês de envelhecimento, as médias dos tratamentos de Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano apresentaram aumento, sendo o último com maior valor médio de concentração de ácido acético equivalente a 189

mg·L^{-1} (Tabela 5). Em seguida, as concentrações médias deste ácido nos tratamentos Cabreúva e Carvalho Americano apresentaram ligeira diminuição, enquanto o tratamento Amburana atingiu seu maior valor médio (192 mg·L^{-1}) durante o período de envelhecimento aos 6 meses.

Sob a acidez volátil, Angeloni (2016) constatou um aumento na concentração de ácido acético passando de 64 para 290 mg· L^{-1} ao final do período de envelhecimento de 5 meses em barris de carvalho novos. O autor associou este comportamento à presença de leveduras selvagens do gênero *Brettanomyces* e à intrinsidade de formação do ácido acético em decorrência de seu metabolismo (DAENEN, 2008).

4.2.3. Análise univariada dos parâmetros físico-químicos

4.2.3.1. Fenólicos

A evolução observada na concentração de compostos fenólicos totais apresentou comportamento diferente das madeiras brasileiras em relação ao Carvalho Americano (Tabela 6 e Figura 17). O teor de fenólicos totais passou de 656 mg de ácido gálico·L^{-1} no tratamento anterior ao envelhecimento em barris, e atingiu médias de 841, 910 e 660 mg de ácido gálico·L^{-1}, que representam incrementos de 22, 28 e 1%, para os tratamentos Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano, respectivamente. Angeloni (2016) observou em cerveja envelhecida durante 5 meses em barris de carvalho a evolução da concentração de fenólicos apresentou incremento relativo da ordem de 20 % sob condição de envelhecimento em temperatura acima de 20 °C. A extração de compostos fenólicos está relacionada tanto ao tempo de contato com a madeira quanto à composição química da espécie utilizada em tanoaria (CILLIERS; SINGLETON, 1990). As concentrações de fenólicos totais dos tratamentos envelhecidos foram superiores às amostras de diferentes estilos de cervejas analisadas por Moura-Nunes et al. (2016), cuja faixa de concentração foi entre 164 e 572 mg de ácido gálico·L^{-1}.

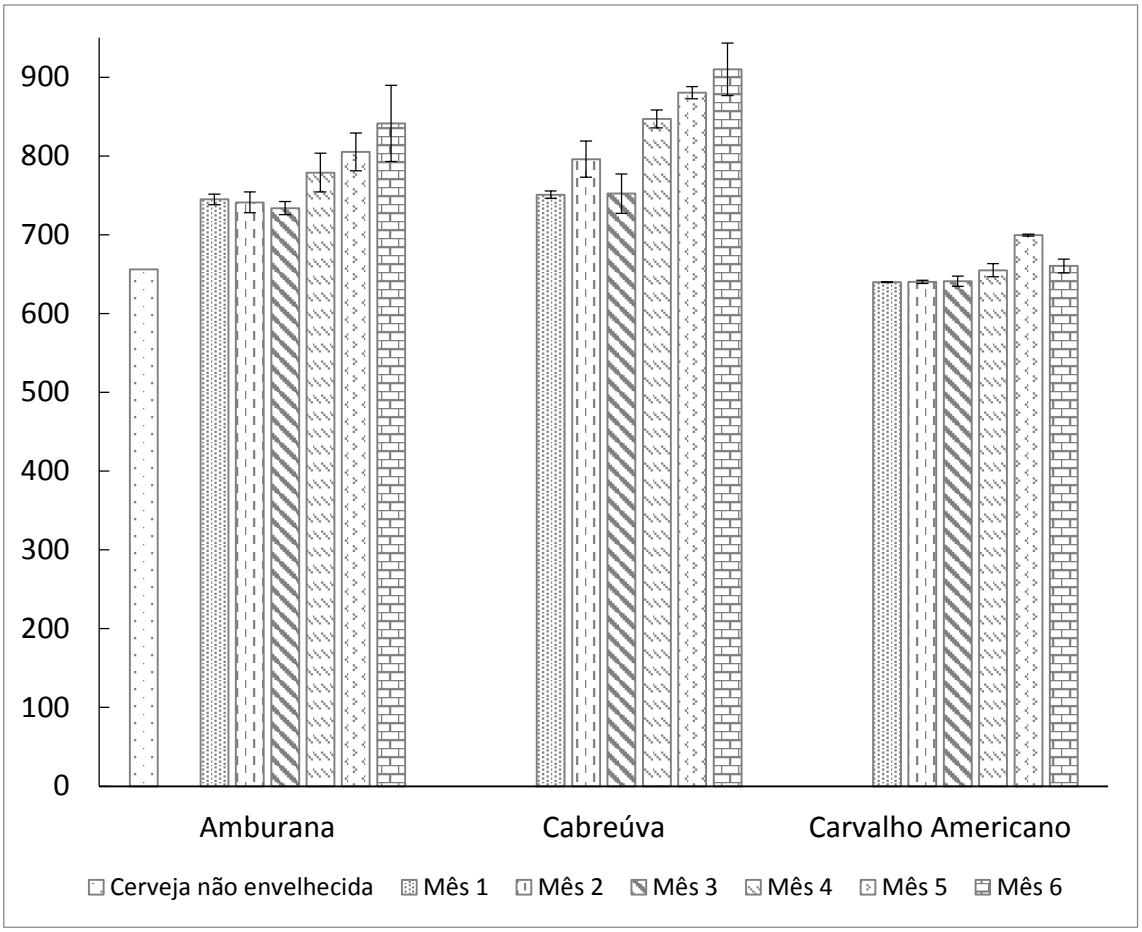


Figura 17. Evolução da concentração de compostos fenólicos totais (em mg de ácido gálico·L^{-1}) na cerveja Barleywine envelhecida em barris de diferentes madeiras.

Ao mesmo tempo que ocorre a solubilização de compostos fenólicos durante o contato com cerveja ou qualquer outra matriz alcoólica, reações de polimerização destes compostos pode causar o incremento de medidas de coloração de bebidas envelhecidas (GARDNER; MCGUINNESS, 1977; CILLIERS; SINGLETON, 1990). As reações de polimerização são influenciadas também pela oxigenação da bebida, processo que ocorre naturalmente pelo aporte de oxigênio de suas formas reativas através dos poros da madeira e contribui para formação de compostos antociânicos polimerizados de coloração (SÁNCHEZ-IGLESIAS et al., 2009). Foi possível observar a contribuição do processo de envelhecimento no aumento de medida de coloração (EBC, 2000) das cervejas envelhecidas.

4.2.3.2. Amargor

Durante a maturação e o envelhecimento da cerveja, o comportamento natural da medida de amargor das cervejas é diminuir, uma vez que ocorre a degradação das moléculas de amargor vindas do lúpulo e isomerizadas durante a fervura, os iso-α-ácidos (VANDERHAEGEN, 2006). A principal via de degradação dos iso-α-ácidos corresponde à oxidação destes, e esta reação gera precursores de compostos indesejados em cervejas, ou *off-flavours* (HASHIMOTO; SHIMAZU; ESHIMA, 1979), bem como a diminuição em concentração dos principais compostos

que conferem amargor à bebida, o que justifica a importância do conhecimento destas vias para o processo maturação em garrafa e estabilidade da bebida (BAMFORTH; LENTINI, 2011) ao longo do tempo.

A análise espectrofotométrica de amargor foi desenvolvida para quantificar os compostos apolares presentes na cerveja (EBC, 2004), o que torna esta metodologia favorável à quantificação de compostos de amargor em cervejas pouco complexas. Para análise de cervejas que tiveram contato com madeira, a quantificação da medida de amargor, expressa em EBU pode, pode sofrer interferência direta dos compostos da madeira, principalmente resinas.

Resinas correspondem a uma mistura de compostos da madeira que são extraídos por meio de solventes apolares, e são majoritariamente compostas por ácidos graxos de cadeia longa (ácidos láurico, oleico, cáprico e mirístico), terpenos (pineno, limoneno, terpineol), ácidos resinosos (ácido abiético e dehidroabiético), lignanas e fenóis apolares (isoeugenol, eugenol, estilbenos) (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990). O teor de resina contido na madeira depende da espécie e varia de 3 a 5 % da massa seca da madeira, porém pode corresponder a proporções bem maiores ao tratar de espécies tropicais e subtropicais (FENGEL; WEGENER, 1984).

Neste projeto, a evolução do amargor da cerveja do tipo Barleywine mostrou-se bastante distinta entre os tratamentos de diferentes madeiras durante o envelhecimento em barris. A cerveja inicialmente com 33,5 EBUs mostrou diminuição na média da medida de amargor durante o envelhecimento em barril Carvalho Americano e atingiu 21,4 EBUs ao final dos 6 meses de envelhecimento (Tabela 6). O comportamento observado foi semelhante ao relatado por Angeloni (2016) durante o envelhecimento de cerveja em barris de carvalho durante 5 meses, onde a medida de amargor diminui de 16 e atingiu 12 EBU.

Este resultado pode estar relacionado à degradação oxidativa dos compostos de amargor (HASHIMOTO; SHIMAZU; ESHIMA, 1979) em barris de madeiras remanufaturados vindos do mesmo fornecedor dos barris deste projeto, que já não apresentam resquícios de resinas extrativos apolares da madeira que foram outrora solubilizadas por uma bebida alcoólica (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990) em uso anterior. Ao empregar cubos de carvalho novos com tosta alta na maturação de cervejas, Wyler et al. (2015) constatou o aumento do amargor das amostras em relação ao controle (cerveja sem cubos) durante o primeiro mês do processo. Neste caso é possível atribuir este aumento aos extrativos solubilizados em um primeiro instante no processo de maturação.

As madeiras brasileiras estudadas neste projeto, Amburana e Cabreúva, apresentaram evolução distinta, em relação ao Carvalho Americano, quanto à medida de Amargor (EBU) (Figura 18). A Cabreúva mostrou valores próximos ao longo de todo o período de envelhecimento, porém acima de 39 EBUs (valor superior à medida inicial) e atingiu 44 EBUs ao final de 6 meses de envelhecimento. É possível observar que durante o primeiro mês o amargor passou de 33 e atingiu 40 EBUs, o que representa o maior aumento na série de medições para este tratamento.

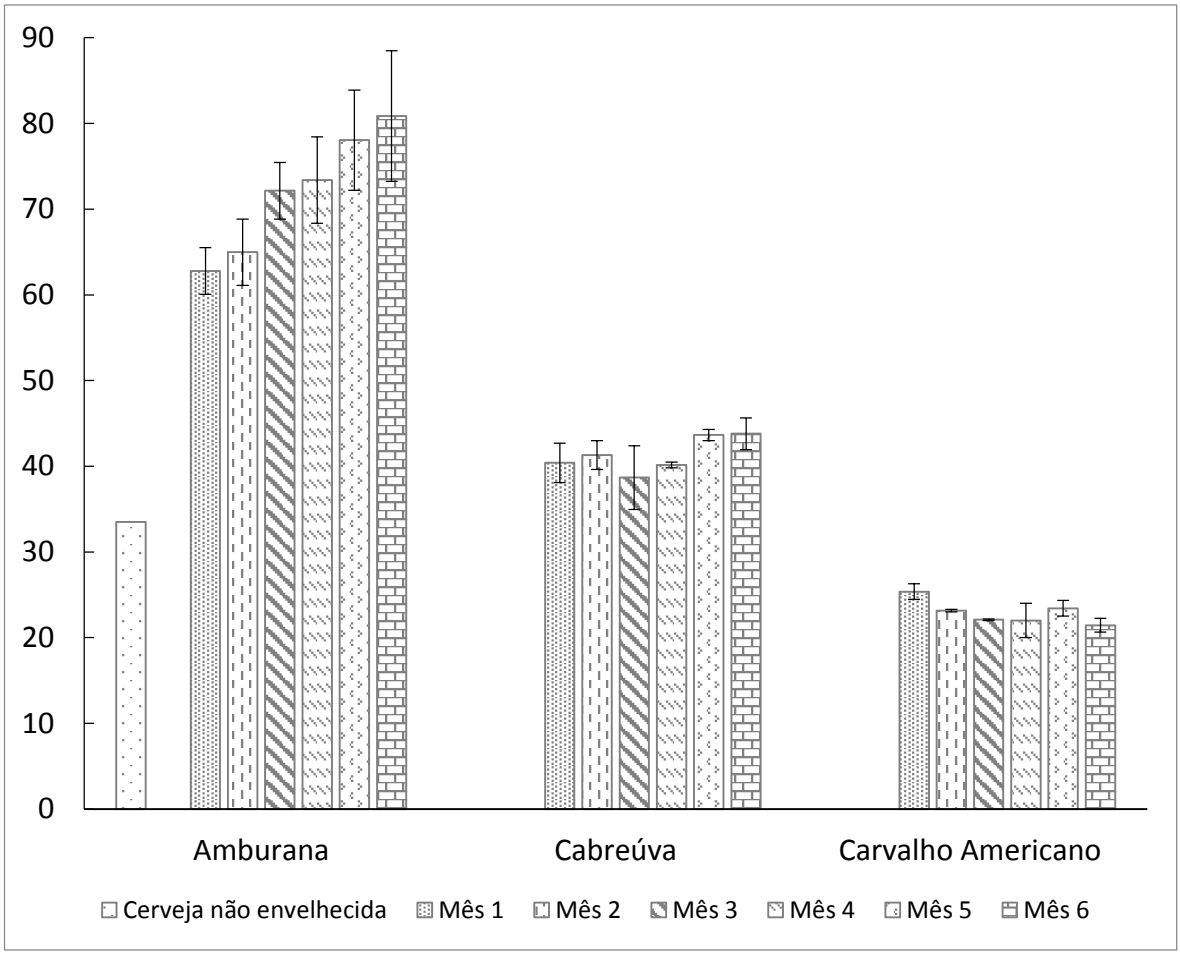


Figura 18. Evolução da concentração de amargor (EBU) na cerveja Barleywine envelhecida em barris de diferentes madeiras.

A cerveja envelhecida em barris de Amburana apresentou as maiores médias de medidas de amargor durante todo o período de envelhecimento (Figura 18). Logo após o 1º mês de envelhecimento, o amargor atingiu 63 EBUs, e ao final do processo aos 6 meses, 81 EBUs. Apesar desta medida de amargor indicar uma amostra com gosto amargo pronunciado, este atributo não foi associado à amostra Amburana durante a análise sensorial (Figura 24). Neste caso, o gosto amargo estava mais próximo na descrição da amostra não envelhecida.

Leão (2006) realizou estudo de quantificação comparativo de extrativos totais e lignina insolúvel de Amburana (*Amburana cearensis*) e Carvalho (*Quercus* sp.), e observou que a Amburana apresentava quantidade duas vezes maior de extrativos totais em relação ao Carvalho, e teor de lignina insolúvel superior em Amburana em relação à outra espécie de madeira. A lignina insolúvel pode estar relacionada à maior leitura de compostos apolares presentes na cerveja envelhecida em barris de Amburana.

A composição majoritária do extrato alcoólico de Amburana, identificada por Leão (2006), consiste em ácidos graxos (não identificados), ácido 2-etil-hexanoico e cumarina (1,2-benzopirano), sendo este último composto responsável por propriedades aromáticas (OSÓRIO; MARTINS, 2004). A relação observada neste projeto sobre o aumento da medida de amargor na cerveja envelhecida em Amburana pode estar relacionada também à solubilização, ao longo do tempo, destes ácidos graxos apolares, com comportamento incialmente de extração rápida e, em seguida mais lenta, a partir do 1º mês (curva de saturação).

4.2.3.3. Coloração

A medida de intensidade de coloração das cervejas (EBC, 2000) apresentou correlação alta (0,70) com o teor de compostos fenólicos totais (Figura 13). A coloração inicial próxima de 60 EBC evoluiu de forma distinta para os diferentes tratamentos (Figura 19). No período de 1 mês, a média das medidas de coloração das cervejas de todos os tratamentos decaíram, e seguida, no restante do período de envelhecimento, é possível destacar os maiores valores de média de coloração (EBC) para a cerveja envelhecida em barris de Cabreúva (Tabela 6).

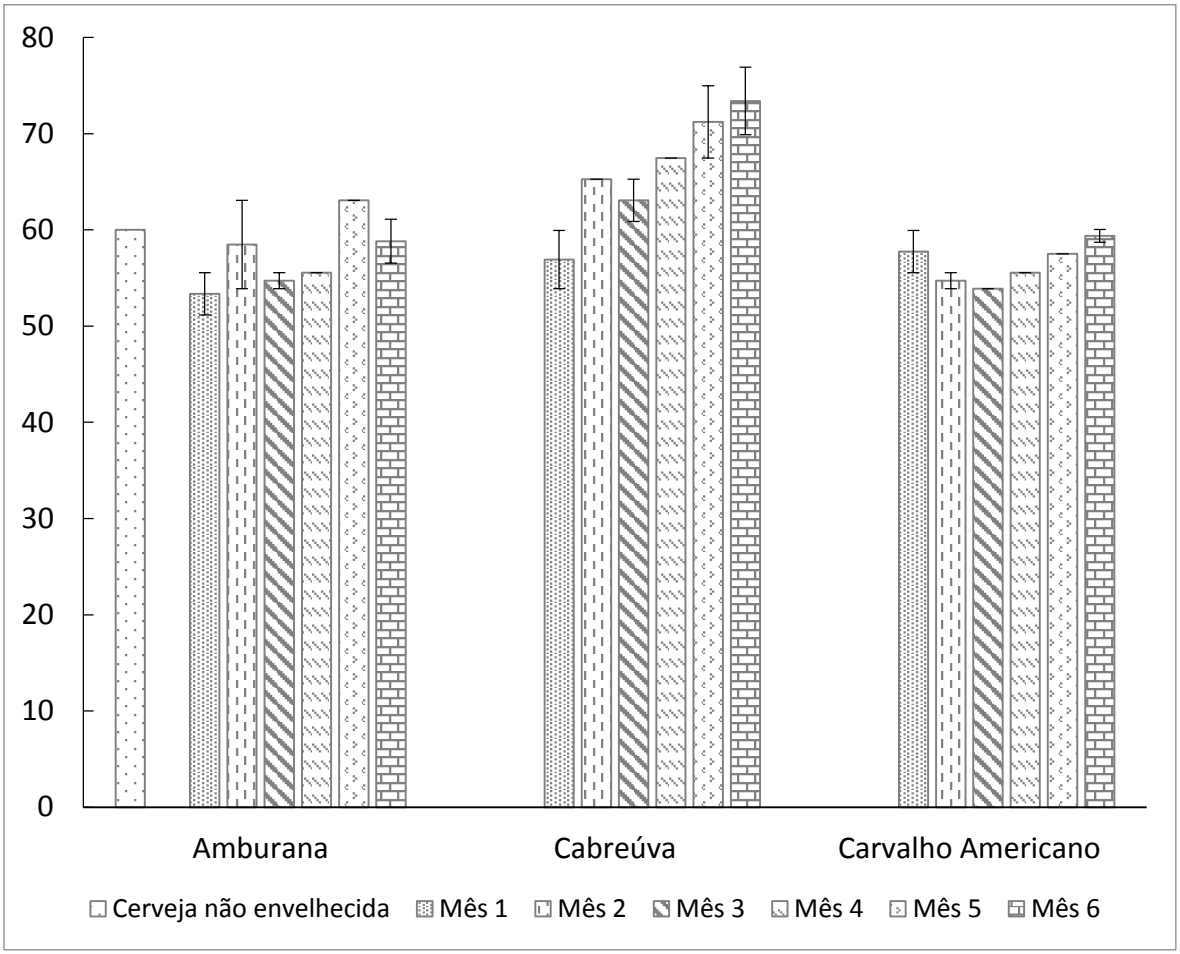


Figura 19. Evolução da intensidade de coloração (EBC) na cerveja Barleywine envelhecida em barris de diferentes madeiras.

Ao final dos 6 meses de envelhecimento, a cerveja que permaneceu em barris de Cabreúva apresentou média de coloração medida 73 EBC, acima da coloração inicial de 60 EBC. Já as cervejas envelhecidas em Amburana e Carvalho Americano obtiveram coloração muito próxima àquela da cerveja Barleywine anterior ao envelhecimento (Tabela 6). Angeloni (2016) verificou aumento da coloração de cerveja envelhecida em barris de carvalho por 5 meses, e passou de 28,7 para 34,1 EBC.

Apesar de as cervejas envelhecidas em madeiras nacionais apresentarem concentração de fenólicos totais elevadas e próximas entre si (Figura 13) e haver alta correlação (0,70) entre teor de compostos fenólicos totais e coloração (Figura 12), é possível explicar este fenômeno segundo a composição fenólica das diferentes madeiras. A

Amburana apresenta alto teor de extrativos constituído principalmente por ácidos graxos e cumarinas (LEÃO, 2006), enquanto a Cabreúva apresenta maior concentração de flavonoides e antraderivados (SAKITA; VALILO, 1990).

Os flavonoides da Cabreúva podem formar complexos antociânicos hidrossolúveis naturalmente no vegetal (GARDNER; MCGUINNESS, 1977; CILLIERS; SINGLETON, 1990), ou serem complexados via formação de pontes de etila na presença de acetaldeído (DELCOUR et al., 1982; SAUCIER et al., 1997). Compostos antraderivados, ou antraquinonas, são compostos heterociclos naturais de espécies vegetais, amplamente empregados na indústria de corantes e pigmentos (HARRIS, 1999) com coloração conferida variando de alaranjado até azul (WARING, 1984).

Ao ser testada a correlação entre a coloração e o teor de acetaldeído da cerveja envelhecida em barris de Cabreúva, foi possível verificar valor alto positivo de 0,88 (Figura 20), o que pode ser um indício da via de formação de compostos antociânicos via polimerização de polifenois solubilizados pela matriz cerveja e formação de pontes de etila em condição de presença de aldeído acético, fato condizente com resultados de Sakita e Valilo (1990), Delcour et al. (1982) e Saucier et al. (1997).

	Tempo_envelhecimento	Teor_Alcoólico_.vol.	Acetaldeído	Acetato_Etila	N_propanol	Iso_butanol	Álcool_Isoamílico	Ácido_Acético	Soma_Alcoois_Superiores	Fenólicos_Totais	pH	Coloração	Amargor
Tempo_envelhecimento	1	-0.69	0.88	0.76	-0.36	0.11	-0.34	0.15	-0.32	0.9	-0.25	0.85	0.61
Teor_Alcoólico_.vol.	-0.69	1	-0.51	-0.37	0.73	0.61	0.72	-0.26	0.71	-0.72	0.7	-0.44	-0.73
Acetaldeído	0.88	-0.51	1	0.92	-0.32	0.02	-0.27	-0.17	-0.25	0.75	0.03	0.88	0.46
Acetato_Etila	0.76	-0.37	0.92	1	-0.26	0.08	-0.16	-0.26	-0.15	0.62	0.18	0.7	0.41
N_propanol	-0.36	0.73	-0.32	-0.26	1	0.93	0.97	0.3	0.98	-0.58	0.57	-0.24	-0.7
Iso_butanol	0.11	0.61	0.02	0.08	0.93	1	0.96	0.26	0.97	-0.37	0.68	0.04	-0.53
Álcool_Isoamílico	-0.34	0.72	-0.27	-0.16	0.97	0.96	1	0.27	1	-0.57	0.67	-0.27	-0.63
Ácido_Acético	0.15	-0.26	-0.17	-0.26	0.3	0.26	0.27	1	0.28	0.03	-0.33	0.11	[illegible]
Soma_Alcoois_Superiores	-0.32	0.71	-0.25	-0.15	0.98	0.97	1	0.28	1	-0.55	0.66	-0.23	-0.64
Fenólicos_Totais	0.9	-0.72	0.75	0.62	-0.58	-0.37	-0.57	0.03	-0.55	1	-0.38	0.78	0.82
pH	-0.25	0.7	0.03	0.18	0.57	0.68	0.67	-0.33	0.66	-0.38	1	-0.22	-0.54
Coloração	0.85	-0.44	0.88	0.7	-0.24	0.04	-0.27	0.11	-0.23	0.78	-0.22	1	0.49
Amargor	0.61	-0.73	0.46	0.41	-0.7	-0.53	-0.63	[illegible]	-0.64	0.82	-0.54	0.49	1

Figura 20. Matriz de correlação de Pearson realizada sobre os resultados obtidos a partir de leituras de quantificação dos parâmetros cromatográficos e físico-químicos do tratamento Cabreúva (*Myrocarpus frondosus*).

4.2.3.4. pH

Durante o processo de fermentação da cerveja, ocorrem transformações como formação de compostos carbonílicos, álcoois superiores, ésteres, compostos sulfurosos e ácidos orgânicos, alteração do potencial redox da cerveja, precipitação de substâncias de amargor, diminuição da intensidade de coloração e diminuição do pH (KUNZE, 2004). Todas estas transformações são devidas ao metabolismo das leveduras.

Kunze (2004) pontua que o pH do mosto, antes de ser inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* pode variar entre 5,3 e 5,6, e na cerveja pronta entre 4,3 e 4,6. Esta diminuição do pH é ocasionada pela formação de ácidos orgânicos, o uso de íos de fosfato pela levedura (diminuição do efeito tampão) e a captura de íons de potássio e liberação de hidrogênio na cerveja. O aumento do pH durante ou após a fermentação é um indicativo de ocorrência de autólise celular (KUNZE, 2004), o que pode originar diversos aromas indesejados na bebida (PICKERELL et al., 1991, DHARMADHIKARI, 1995; STAFFORD, 2003).

A medição do pH da cerveja não envelhecida foi de 5,18 e atributos sensoriais descritores de aromas indesejados foram identificados pelo painel de provadores (Figura 23). Ao longo do período de envelhecimento, foi observada diminuição do pH durante 2 meses, e em seguida manteve-se praticamente estável até o final do período de 6 meses (Figura 21) para os tratamentos das três madeiras investigadas. Ao final do processo de envelhecimento, o pH das amostras permaneceu em uma faixa entre 4,7 e 4,8 (Tabela 6).

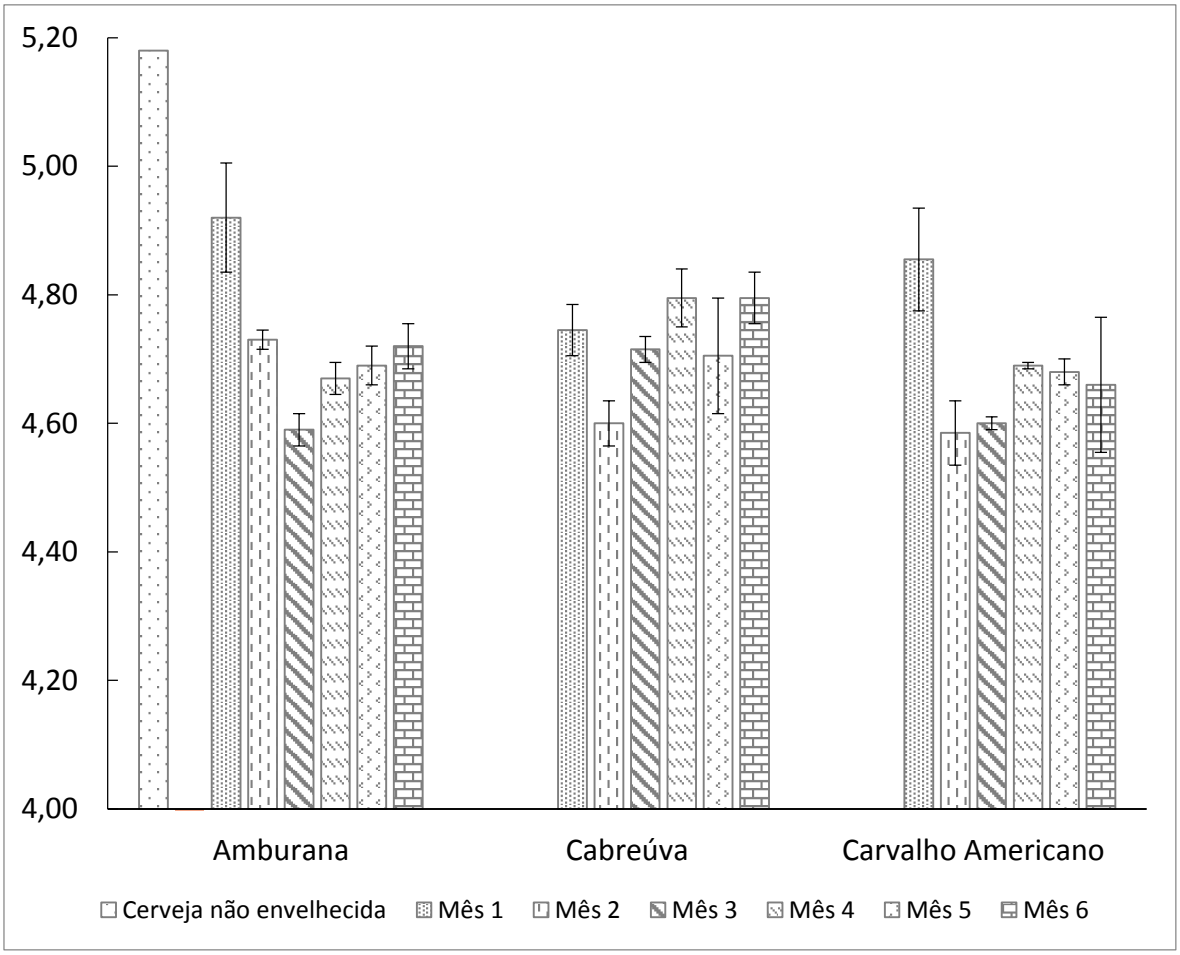


Figura 21. Evolução das medidas de pH na cerveja Barleywine envelhecida em barris de diferentes madeiras.

O comportamento de decréscimo do pH pode estar relacionado principalmente à atividade microbiológica e formação de ácidos orgânicos excretados pelos microrganismos na cerveja durante o envelhecimento em diferentes barris (KUNZE, 2004), mas também pela extração de compostos ácidos da madeira, como ácidos fenólicos (SIERRA-ALVAREZ; LETTINGA, 1990) e pela oxidação de álcoois e aldeídos e formação de ácidos (RAMIREZ-RAMIREZ, 2002).

Angeloni (2016) constatou decréscimo de pH em cerveja envelhecida em barris de carvalho, inicialmente na ordem de 4,9 e atingiu 4,2 ao final do período de envelhecimento de 5 meses de uma cerveja que propiciou o desenvolimento de leveduras selvagens, bactérias láticas e acéticas. De acordo com estudos de Wyler et al. (2015), o valor de pH em cerveja envelhecida em barris de carvalho permaneceu na faixa de 4,6 durante o período de 3 meses, e estes valores não diferiram estatisticamente de tratamentos que empregaram maturação com lascas de madeira de carvalho.

4.3. Resultados Sensorial

Após a Análise Fatorial Múltipla (AFM) realizada sobre os dados do *Napping*, foi observado que a aproximadamente 80 % da variância total entre as amostras foi explicada pelas duas primeiras dimensões fatoriais. Em resultado à tarefa de distribuição espacial das amostras pelo painel de provadores, foi observada a capacidade de distinção completa entre todas as amostras estudadas, uma vez que as regiões das elipses de confiança geradas por método de *bootstrap* empregando painel virtual composto por 500 provadores e nível de confiança de 95 % (LÊ; HOUSSON, 2008) encontram-se sem sobreposição (Figura 22).

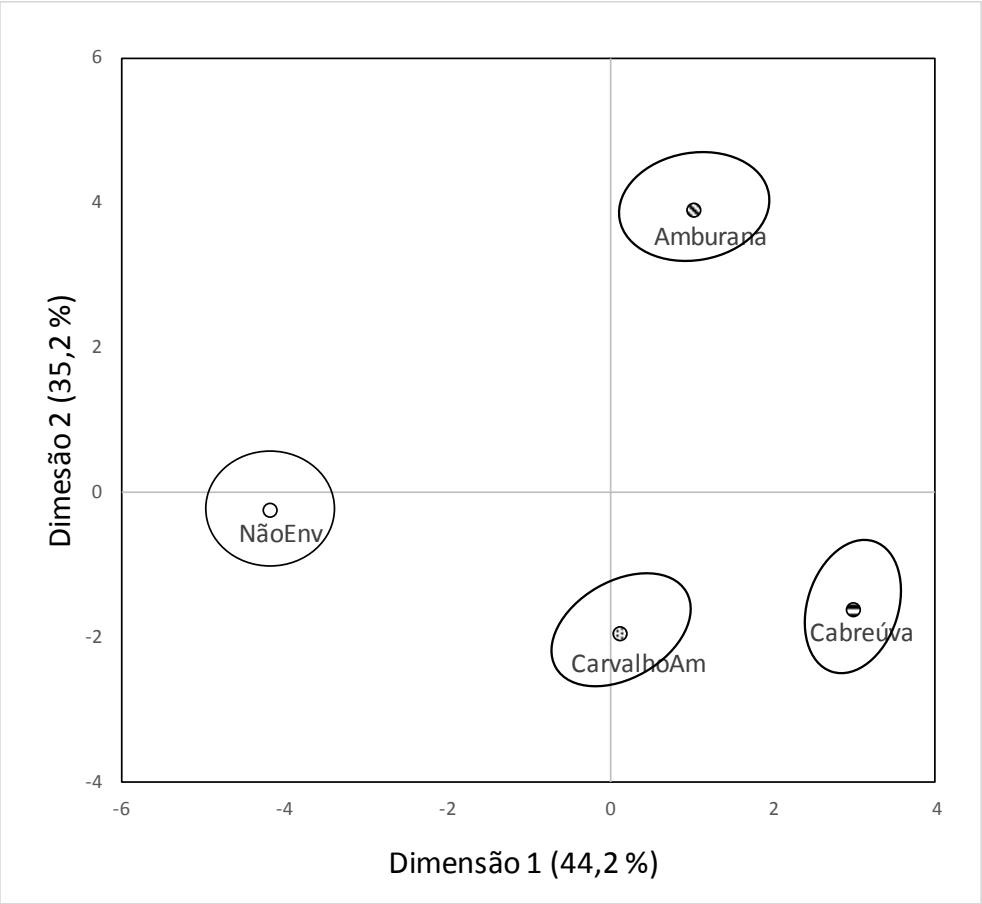


Figura 22. Representação das cervejas Barleywine não envelhecida (BW_0), e envelhecidas em barris de Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano (CarvalhoAm) e de suas elipses de confiança (95 %) nas duas primeiras dimensões geradas pela AFM sobre os resultados de *Napping*.

Na análise do primeiro plano multidimensional, formado pelas duas primeiras dimensões, foi possível observar pelo confronto entre o gráfico de variáveis suplementares correspondentes aos atributos sensoriais definidos pelo painel de avaliadores durante a análise *Ultraflash profile* (UFP). Os atributos melhores representados no eixo horizontal, com valor de cos^2 maior que 0,55, acima do valor de 0,50 considerado geralmente para uma boa representação (FERNANDO, 2014) estão representados na (Figura 23). Na projeção dos indivíduos na primeira dimensão, que explica 44,2 % da variância total entre os tratamentos, foi observada a diferenciação entre o tratamento da cerveja Barleywine não envelhecida (BW_0) em relação às cervejas envelhecidas em barris de diferentes madeiras durante 6 meses.

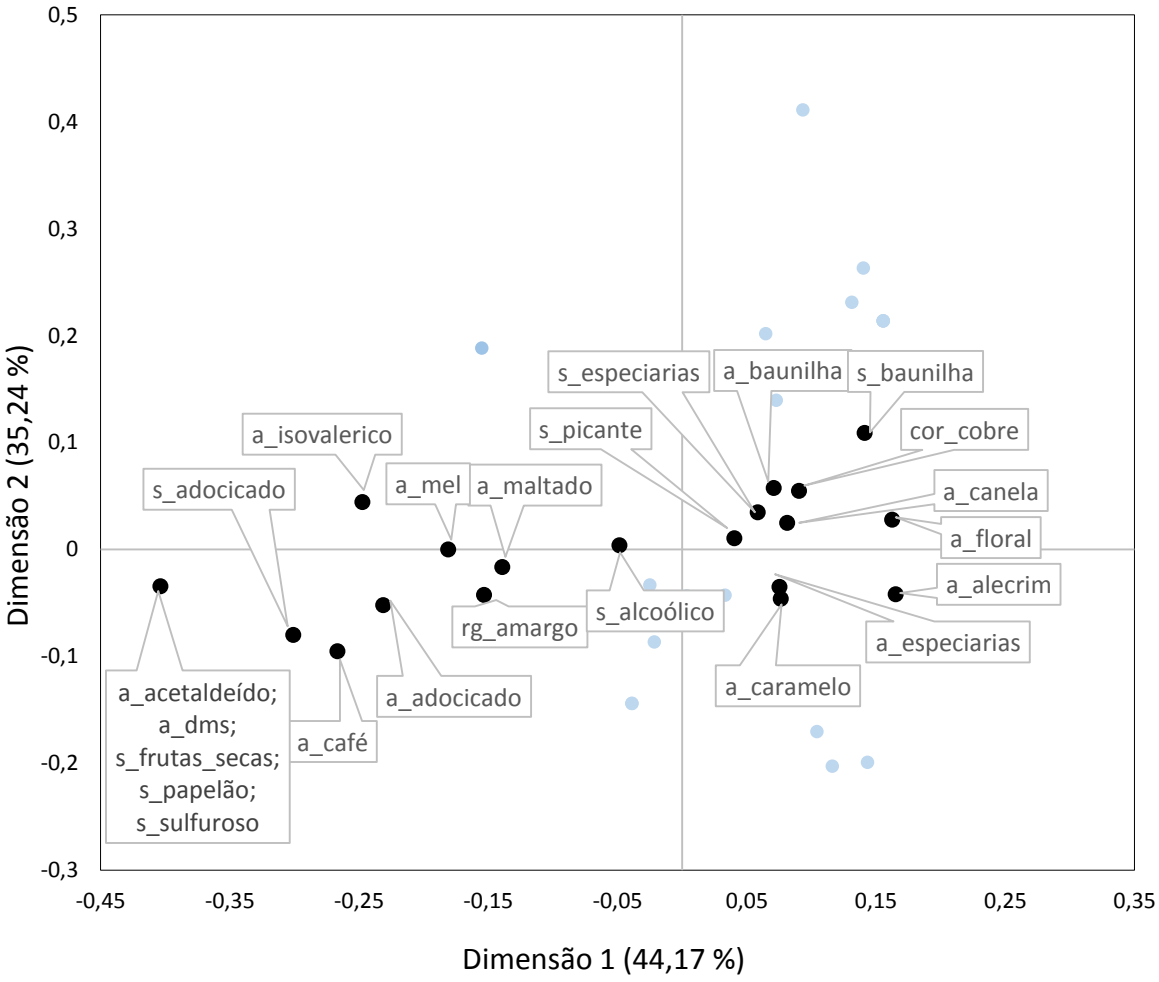


Figura 23. Atributos que apresentaram melhor representação ($cos^2 > 0,55$) na terceira dimensão da AFM realizada sobre os resultados do *Napping*, levantados para descrição das cervejas durante análise *Ultraflash profile* realizada.

Os atributos relacionados à cerveja não envelhecida incluem descritores das características originais da cerveja como aromas adocicado, de mel, de café e maltado, sabores adocicado, sabores e aromas de defeitos da cerveja (DMS, papelão, sulfuroso, acetaldeído), provavelmente desenvolvidos durante o armazenamento da cerveja que continha células em suspensão (DE MORA et al., 1986; LANDAUD; HELINCK; BONNARME, 2008; VANDERHAEGEN et al., 2006), o que mostra um perfil mais relacionado às matérias primas e prevalência de *off-flavours* de armazenamento.

A identificação dos aromas e sabores indesejados pode estar diretamente relacionada ao pH. Uma cerveja pronta deve apresentar pH em torno de 4,3 a 4,6. Valores acima desta faixa, como é o caso da medição da cerveja não envelhecida de 5,2, podem ser indicativo do acontecimento de autólise celular (KUNZE, 2004), que é o fenômeno de rompimento da membrana e exposição do material intracelular na cerveja finalizada, que acarreta aromas sulfuroso, rançoso pela presença de ácidos graxos e ésteres de cadeia longa (PICKERELL et al., 1991, DHARMADHIKARI, 1995; STAFFORD, 2003).

Os atributos relacionados às cervejas que passaram pelo processo de envelhecimento em barris de madeiras estão relacionados descritores de aromas floral, de alecrim, de especiarias, de canela, de caramelo, de

baunilha, sabores de especiarias e baunilha, e sensação picante. Estas características podem estar relacionadas a compostos oriundos da madeira, como no caso de descritores de especiarias e canela serem os atributos de aroma conferidos pela composição de fenólicos, como os aldeídos cinâmicos, ácidos cinâmico, hidróxicinâmico e eugenol (LEÃO, 2006; POISSON; SCHIBERLE, 2008; SILVA et al., 2012; STERCKX et al., 2012). Os descritores empregados na caracterização das cervejas envelhecidas em barris de madeira coincidem com termos empregados por Dawson (2014) na roda de aromas de cervejas envelhecidas em garrafa na descrição de diferentes estilos de cerveja que passaram pelo processo de envelhecimento em madeira: "caramelo", "baunilha", "canela" e "coco".

Os atributos relacionados a aroma e sabor de baunilha podem estar relacionados à concentração do composto vanilina, oriundo da degradação da lignina pelo bloco guaiacil (PUECH, 1981; DIAS; MAIA; NELSON, 1998; AYLOTT; MACKENZIE, 2010). A vanilina pode ser encontrada em diferentes espécies de madeiras, incluindo Amburana e Cabreúva, segundo estudo de Bortoletto e Alcarde (2013) que avaliou a contribuição de diferentes espécies de madeiras para composição quanto a marcadores de envelhecimento em cachaças envelhecidas. A concentração de vanilina oriunda dos barris de Amburana e Cabreúva em relação ao Carvalho, correspondem a 39 % e 47 %, respectivamente (BORTOLETTO; ALCARDE, 2013).

Pela proximidade da projeção das amostras de cervejas envelhecidas em diferentes madeiras sobre o a primeira dimensão é possível observar que o principal critério de diferenciação empregado pelo painel de avaliadores corresponde ao processo de envelhecimento, refletido no distanciamento em relação às características originais da cerveja Barleywine.

Ainda no primeiro plano dimensional gerado, em relação à projeção das amostras sobre a segunda dimensão (que contém 35,2 % da variância total entre as amostras) foi observada a distinção entre a cerveja envelhecida em barris de amburana em relação às demais amostras (Figura 22). Quando projetadas sobre o eixo vertical, a amostra relativa à cerveja não envelhecida se encontra próxima à origem do plano gerado, enquanto que as amostras envelhecidas em barris de Carvalho Americano e Cabreúva apresentam coordenadas negativas e a amostra de Amburana, por sua vez, apresentou coordenadas positivas e maior distanciamento em relação às demais.

Para compreensão da diferenciação representada pela segunda dimensão multivariada, foram destacados os atributos com melhor representação no eixo vertical, com valor de cos^2 maior que 0,55, para caracterização das amostras. A amostra representada por Amburana pode ser caracterizada pelos atributos suplementares de aromas amadeirado, torrado, de papelão, alcaçuz, banana, tabaco e amadeirado, gosto salgado, sabor fenólico e de canela e retrogosto amadeirado (Figura 24). Alguns atributos como gosto salgado, sabor fenólico e retrogosto amadeirado atribuídos principalmente à amostra de Amburana podem estar relacionados à composição da madeira. Que apresenta maior teor de minerais e extrativos quando comparado a outras espécies (Tabela 1). As demais amostras são caracterizadas pela coloração próxima (âmbar profundo e castanho claro), aroma de cumaru, gostos ácido e amargo, sabores de mel e caramelo, sensação de frescor e corpo baixo e retro gosto picante.

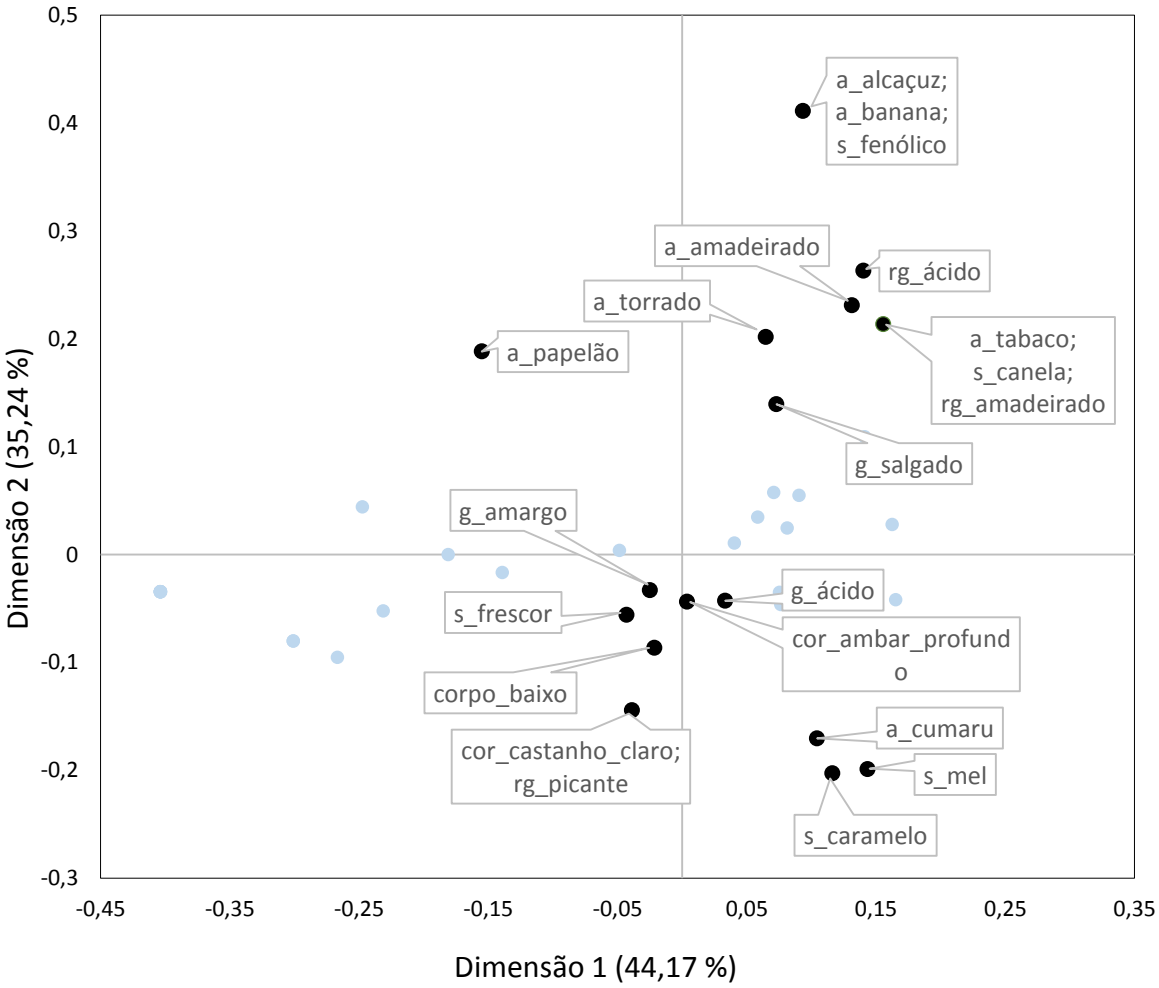


Figura 24. Atributos que apresentaram melhor representação ($cos^2 > 0,55$) na terceira dimensão da AFM realizada sobre os resultados do *Napping*, levantados para descrição das cervejas durante análise *Ultraflash profile* realizada.

A principal distinção descrita pelo eixo que representa a dimensão 2 está provavelmente relacionada às características aportadas pela amburana, como o aroma amadeirado provavelmente mais acentuado, sabor fenólico e retro gosto ácido e amadeirado mais proeminentes, frente às sensações de características mais brandas nas demais amostras, como descrito pela sensação de corpo baixo e características mais similares às da cerveja não envelhecida, descritas pelos atributos de sabores de mel e caramelo. Tais características menos brandas da Amburana podem ser descritas pela composição fenólica e análise de amargor, com medição de compostos apolares da resina, que foi superior em concentração nas cervejas ao longo do processo de envelhecimento (Tabela 6).

A madeira da Amburana pode apresentar concentrações superiores de ácidos graxos, como o 1-dodecanol, ácido 2-etil-hexanoico e dihidrocumarina (LEÃO, 2006) em relação às demais madeiras investigadas neste estudo. As cumarinas são compostos de importantes propriedades de aromas (OSÓRIO; MARTINS, 2004). Dentre os descritores aromáticos desta classe de compostos encontram-se o herbáceo adocicado (YANG et al., 2009), que pode remeter a baunilha e feno (MAXWELL, 2017) e aroma vegetal (STEWART, 2005). Estes descritores apresentam conformidade com o léxico formado pelos atributos apresentados ao painel de avaliadores durante o

treinamento para análise sensorial e posteriormente identificados na análise UFP para a amostra Amburana, e representados nas duas primeiras dimensões geradas pela AFM (Figuras 15 e 16).

Em vista a uma melhor interpretação das diferenças entre as cervejas envelhecidas em barris de Carvalho Americano e Cabreúva, foi gerado um segundo plano de representação multidimensional que engloba a segunda dimensão, já analisada, e a terceira dimensão que contém 20,6 % da variância total entre as amostras (Figura 25). A soma da variância das 3 dimensões representadas corresponde a 100 % da variância total (Tabela 7).

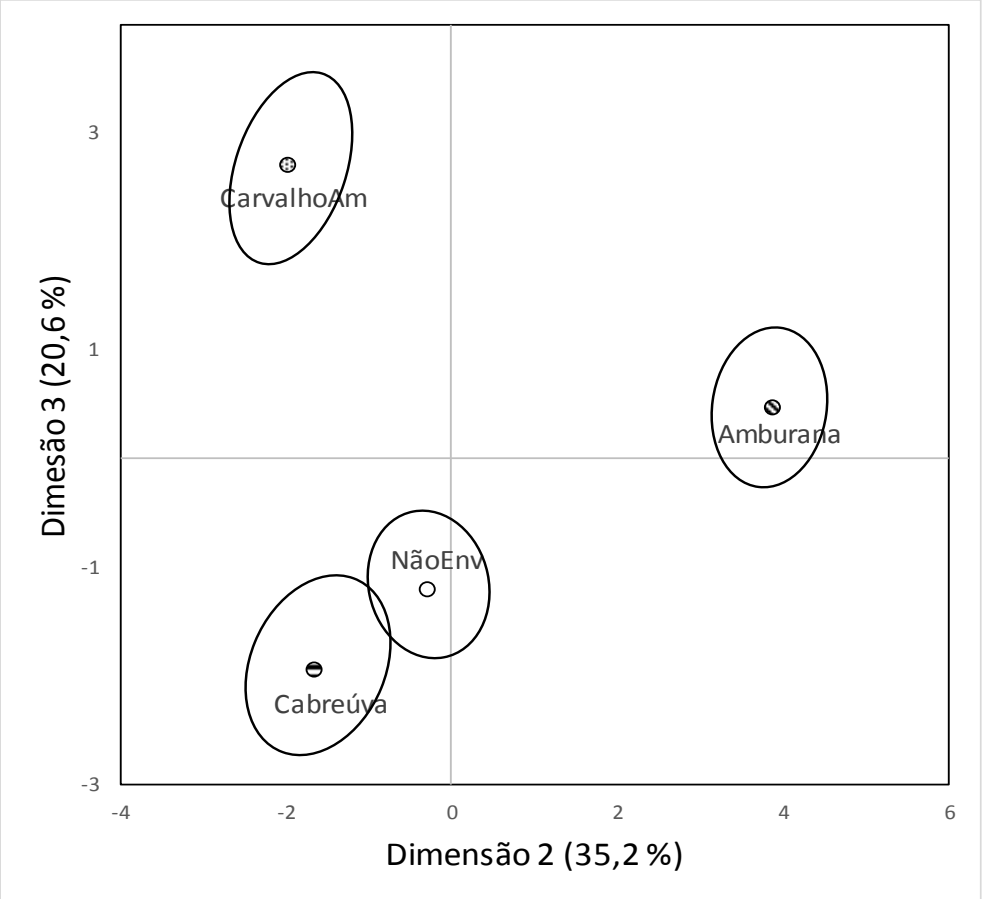


Figura 25. Representação das cervejas Barleywine não envelhecida (BW_0), e envelhecidas em barris de Amburana, Cabreúva e Carvalho Americano (CarvalhoAm) e de suas elipses de confiança (95 %) nas dimensões segunda e terceira geradas pela AFM sobre os resultados de *Napping*.

Tabela 7. Autovalores, variância (%) e variância acumulada (%) das três dimensões geradas pela AFM para representação dos resultados de *Napping*.

Dimensão	Autovalor	Variância (%)	Variância acumulada %
1	6,840245	44,173	44,142
2	5,457653	35,244	79,416
3	3,137349	20,583	100,000

Em relação à projeção das amostras sobre o eixo representado pela terceira dimensão (Figura 25), foi possível verificar a distinção entre a cerveja envelhecida em barris de Carvalho Americano e as demais amostras. Os atributos representados na Figura 12 correspondem àqueles correspondentes a variáveis suplementares observadas na tabela de contingência, gerada pela análise de UFP, melhores representados no eixo indicado, com valor de cos^2 maior que 0,55. Foi possível notar a descrição da cerveja envelhecida em carvalho americano determinada por atributos como aromas terroso, alcoólico, de pimenta, de frutas secas e de acetato de etila, e retro gosto adocicado. Os aromas de frutas secas são identificados em uma ampla variedade de cervejas envelhecidas também em garrafas, e estão provavelmente relacionados ao desenvolvimento da composição de ésteres da bebida e podem estar relacionados especificamente a descritores como "uva passa", "figo" e "ameixa" (DAWSON, 2014).

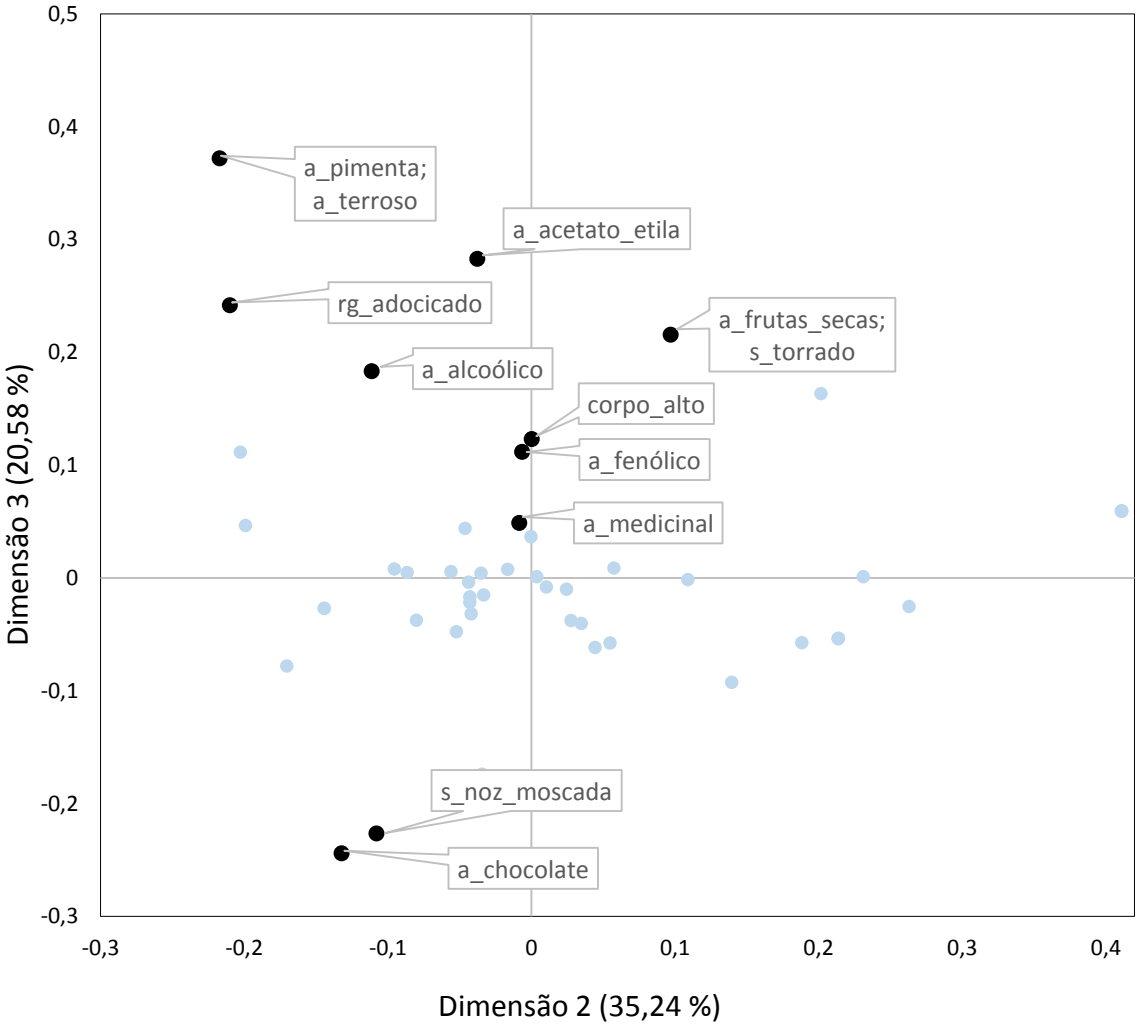


Figura 26. Atributos que apresentaram melhor representação ($cos^2 > 0,55$) na terceira dimensão da AFM realizada sobre os resultados do *Napping*, levantados para descrição das cervejas durante análise *Ultraflash profile* realizada.

A percepção do aroma de acetato de etila está diretamente relacionado com a composição química (Tabela 5) da amostra de Carvalho Americano ao final do período de envelhecimento, quando a amostra apresentou teores de 63 $mg \cdot L^{-1}$ em relação a valores em torno de 11 $mg \cdot L^{-1}$ nos tratamentos Amburana e Cabreúva. Já a cerveja

envelhecida em barris de Cabreúva apresentou como descritores mais bem representados na terceira dimensão os aromas de chocolate e sabor de noz moscada, e pela oposição ao atributo de retro gosto adocicado, provavelmente a percepção final relativa ao sabor residual pode estar relacionada a atributos menos agradáveis (RIERA et al., 2007; REED; KNAAPILA, 2010).

Os atributos empregados pelos avaliadores na descrição das cervejas envelhecidas em barris de diferentes madeiras apresentaram coincidência com atributos selecionados para descrever cerveja do tipo *Red Flanders* investigada por Angeloni (2016). Descritores como frutado, amadeirado, especiarias, fruta passa, caramelo, terroso e floral levantados pelo painel avaliador deste projeto foram condizentes com os atributos selecionados para serem quantificados pelos provadores na pesquisa de AngeloniI (2016), o que mostra conformidade na caracterização de amostras de cervejas envelhecidas em barris de madeiras.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estipular um período de tempo mínimo como estabelecido para algumas bebidas destiladas, para envelhecimento de cerveja em barris de madeira, não deve ser levado em prática. Como observado nesta pesquisa, diferentes espécies de madeiras apresentam diferentes cinéticas de extração e alterações únicas da composição da cerveja no interior do barril. Não há uma resposta única sobre a determinação do ponto final do período de envelhecimento da cerveja. Atualmente para o controle deste processo em cervejarias, a melhor metodologia de monitoramento consiste no acompanhamento da evolução das características sensoriais da bebida. Análises físico-químicas e cromatográficas podem auxiliar na tomada de decisão sobre as etapas durante o processo de envelhecimento.

O comportamento da evolução de alguns fatores se aproximam de um fenômeno de maior dependência da forma de condução do processo de envelhecimento: diminuição do teor alcoólico, extração de compostos fenólicos, concentração de acetaldeído, teor de álcoois superiores e de acidez volátil; maior dependência das condições de uso do barril: crescimento de UFCs, diminuição do pH, concentração de acetato de etila e quantidade de compostos fenólicos extraíveis; e maior dependência da espécie de madeira utilizada: intensidade de coloração, medida de amargor (ou compostos resinosos) e características sensoriais.

O bom desenvolvimento do processo de envelhecimento e a qualidade final da cerveja dependem da escolha do estilo de cerveja (características físico-químicas), da espécie de madeira empregada na fabricação do barril, nas condições da madeira empregada na confecção do barril (condição nova ou remanufatura), do pré tratamento empregado no barril e do controle das condições e do ambiente de envelhecimento da bebida. A partir do estabelecimento claro destes fatores e do objetivo final para a cerveja, é possível aproximar a prática do envelhecimento de cerveja em um processo controlado e evitar imprevistos durante a produção de novos produtos de alto valor agregado.

As madeiras nacionais avaliadas, Amburana e Cabreúva, apresentam grande potencial para aplicação no envelhecimento de cerveja em barris de madeira. Os atributos sensoriais propiciados por estas espécies podem ter interessante papel na formulação de novos produtos e conferir tipicidade a cervejas brasileiras. Da mesma forma que uso de frutos e especiarias nativos do Brasil, o emprego de barris de madeiras nacionais pode auxiliar na caracterização de uma escola cervejeira brasileira, por aproveitar de matérias primas e processos que podem conferir características únicas à bebida.

REFERÊNCIA

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

ALDERTON, G.; BAILEY, G. F.; LEWIS, J. C.; STITT, F. Spectrophotometric Determination of Humulone Complex and Lupulone in Hops. **Analytical Chemistry**, vol. 26, p. 983-992, 1954.

ALMEIDA E SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, G.W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005, 550p.

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Análisis de Vinos y Mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 160 p.

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Methods for analysis of musts and wines**. New York: John Wiley & Sons, 1980. 341p.

AMPESE, M. **Análise do uso de diferentes madeiras locais em vinho tinto**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Golçalves, Rio Grande do Sul.

ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spin trapping identifi cation of radicals formed during aerobic forced aging of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, p. 1272 – 1275, 1998.

ANDERSON, A. B.; SCHEFFER, T. C. Chemistry of decay of heartwood on ageing of incense cedar (Librocedrus decurrens Torrey). **Nature**, vol. 194, p. 410, 1962.

ANGELONI, L. H. P. **Cerveja envelhecida em barril de madeira, aspectos químicos e microbiológicos**. 2016. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2016.

ARES, G.; VARELA, P. Comparison of Novel Methodologies for Sensory Characterization. In: VARELA, P.; ARES, G. **Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling**. CRC Press: Nova Iorque. 2014. Cap. 14, p. 365-389.

AYLOTT, R. I.; MACKENZIE, W. M. Analytical Strategies to confirm the Generic Authencity of Scotch Whisky. **Journal of Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 215-229, 2010.

BAEZA, J.; FREER, J. Chemical Characterization of Wood and Its Components. In: HON, D. N. -S.; SHIRAISI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**, Second Edition, Revised, and Expanded. CRC Press, 2000. 928 p.

BAMFORTH, C. W.; LENTINI, A. The flavor instability of beer. In: BAMFORTH, C. W. **Beer**: A Quality Perspective – A Volume of the Handbook of Alcoholic Beverages Series, Academic Press:EUA, 2011, 304 p. ISBN 9780080926094.

BARRERA-GARCÍA, D.; GOUGEON, D. R.; MAJO, D. D.; AGUIRRE, C. de; VOILLEY, A.; CHASSAGNE, D. Different sorption behaviors for wine polyphenols in contact with oak Wood. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 55, n. 17, p. 7021-7027, 2007.

BARTHELMEBS, L.; DIVIES, C.; CAVIN, J. M. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from Lactobacillus plantarum reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. **Appl. Environ. Microbiol**, vol. 66, p. 3368–3375, 2000.

BAUTISTA, E. A. L.; QUARESMA, E. S.; SANTANA, M. L. Modelos lineares mistos para análise de dados longitudinais provenientes de ensaios agronômicos. **Revista da Estatística UFOP**, vol. 3, p. 649-653, 2014.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM (BJCP). **17D. English Barley Wine.** Style Guidelines. 2015. 79 p.

BIASOTO, A. C. T.; CATHARINO, R. R.; SANVIDO, G. B.; EBERLIN, M. N.; DA SILVA, M. A. A. P. Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. **Food Quality and Preference**, vol. 21, n. 7, p. 755 – 762, 2010.

BOIDRON, J. N.; CHATONNET, P.; PONS M. Incidence du bois de chêne sur certains composés volatils des vins. **Connaissance Vigne Vin**, vol. 22, n. 4, p. 275-294, 1988.

BORTOLETTO, A. **Influência da madeira na qualidade química e sensorial da aguardente de cana envelhecida**. Piracicaba: ESALQ, 2016. 231 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Aging marker profile in cachaça is influenced by toasted oak chips. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 121, p.70-77, 2015.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, v.139, p.695-701, 2013.

BORTOLETTO, A. M.; SOUZA, L. M.; ALCARDE, A. R. Formation of volatile and maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 120, p.529-536, 2014.

BOSSO, A.; PETROZZIELLO, M.; SANTINI, D.; MOTTA, S.; GUAITA, M.; MARULLI, C. Effect of grain type and toasting conditions of barrels on the concentration of the volatile substances released by the wood and on the sensory characteristics of montepulciano d'abruzzo. **Journal of Food Science**, vol. 73, p. 373-382, 2008.

BOULTON, C.; QUAIN, D**. Brewing Yeast and Fermentation**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 644 p.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 04 de julho de 2009. Regulamenta a Lei nº8.918, de 14 de junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**, Brasília, 04 Jun. 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 5º relatório nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica. **Série Biodiversidade**, Brasília, DF, n. 50, 240 p., 2016.

BRIGGS, D.E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice.** Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing Limite, 2004.

BRITO, J. O.; GOMES DA SILVA, F. **Apontamentos de aula: natureza e constituição química da madeira**. Piracicaba: IPEF, 2005.

BUCKEE, G. K. Estimation of α-, β- and iso-α-acids in hops, hop products and beer using high performance liquid chromatography. **Insi. Brew.**, vol. 91, p. 143-147, 1985.

BUTTERY, R. G.; TERANISHI, R.; LING, L. C.; TURNBAUGH, J. G. Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 38, p. 336-340, 1990.

CABRERA, D. C.; GOMES, G. L. S.; FLACH, A.; DA COSTA, L. A. M. A.; ROSA, G. R.; DE MOURA; N. F. Evaluation of climatic factors on the yield and chemical composition of the essential oil of *Myrocarpus frondosus*. **Journal Natural Product Research**, vol. 29, n. 7, p. 667-670, 2015.

CALIXTA, S. T.; AGUIAR, J. L.; BATIZ, H.; HERNÁNDEZ, I. Aging of Rum in a Hot Chamber. **J. of Agric. of Univ. of Puerto Rico**, vol. 63, n. 1, p. 64-77, 1979.

CALLEJO, M. J.; GONZALEZ, C; MORATA, A. Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers, **Brewing Technology**, Ph.D. Makoto Kanauchi (Ed.), InTech, 2017. Disponível em:

<https://mts.intechopen.com/books/brewing-technology/use-of-non-saccharomyces-yeasts-in-bottle-fermentation-of-aged-beers> Acesso em: Abr. 2017.

CAMPO, E.; BALLESTER, J.; LANGLOIS, J.; DACREMONT, C.; VALENTIN, D. Comparison of conventional descriptive analysis and a citation frequency-based descriptive method for odor profiling: an application to Burgundy Pinot Noir wines. **Food Quality and Preference**, vol. 21, p. 44 – 55, 2010.

CANTARELLI, C. Etude de la maderisation et de sa prevention dans les vins blancs. **Deuxième Symposium**; Institute d'OEnologie, Bordeaux Cognac, vol. 2, p. 392− 407, 1967.

CANTWELL, D.; BOUCKAERT, P. **Wood & Beer**: A Brewer's Guide. Boulder, Colorado, Estados Unidos da América: Brewers Publications, 2016. 228 p.

ČÁP, M.; VÁCHOVÁ, L.; PALKOVÁ, Z. Reactive Oxygen Species in the Signaling and Adaptation of Multicellular Microbial Communities. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, ID 976753, 13 p., 2012.

CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Perfil sensorial e características físico-químicas de aguardentes comerciais brasileiras envelhecidas e sem envelhecer. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 20, n. 1, p. 87-100, 2000.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 3ª parte – A maturação. **Revista Analytica**, n.26, p.46-54, 2007.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja – **Consumo de cerveja cresce no país**. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf> Acesso em: Jul. 2016.

CHATONNET, P. La chauffe des barriques contrôlée: bientôt une réalité! **Revue des Oenologues**, n. 90, p. 12-14, 1995b.

CHATONNET, P. Le séchage et la maturation des bois em tonnellerie. **Revue Française d'Oenologie**, Monstreuil, n. 151, p. 33-39, 1995a.

CHEVANCE, F.; GUYOT-DECLERCK, C.; DUPONT, J.; COLLIN, S. Investigation of the β-Damascenone level in fresh and aged commercial beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, p. 3818-3821, 2002.

CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. Autoxidative phenolic ringopening under alkaline conditions as a model for natural polyphenols in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 38, p. 1797–1798, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614019906> Acesso em: Out. 2018.

CLAUSEN, M.; LAMB, C. J.; MEGNET, R.; DOERNER, P. W. Pad1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in Saccharomyces-CereVisiae. **Gene**, vol. 142, p.107–112, 1994.

COGHE, S.; MARTENS, E.; HOLLANDER, H. D.; DIRINCK, P. J.; DELVAUX, F. R. Sensory and industrial flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts. **J. Inst. Brew.**, vol. 110, n. 2, p. 94-103, 2004.

COLLIN, S.; NOËL, S. Réactions chimiques et enzymatiques productrices d'arômes au brassage. **Cerevisia Biotechnology**, vol. 19, p. 25-32, 1994.

COLLIN, S.; NOËL, S.; BONTE, S.; METAIS, N.; BODART, E.; PELADAN, F.; DUPIRE, S. Utilisation d'18O2 pour évaluer l'impact des phénomènes d'oxidation durant le brassage et le stockage de la bière (The use of 18O2 in appraising the impact of oxidation processes during mashing and beer storage). **European Brewery Convention**; IRL Press, Oxford University Press: Oxford, U.K., p 535-544, 1997.

CONNER, J. L.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. The distribution of lignin breakdown produts through new and used cask staves. In: PIGGOTT, J. R.; PATERSON, A. (Ed.) **Distilled beverages flavour:** origin and development. Chichester: Ellis Horwood, 1989. Cap. 15, p. 177-184.

CONNER, J. L.; REID, K.; JACK, F. Maturation and blending. In: RUSSELL, I.; STEWART, G.; BAMFORTH, C. **Whisky. Technology, Production and Marketing**. Londres, Reino Unido: Elsevier, 2003. Cap. 7, p. 209-240.

CRAUWELS, S.; STEENSELS, J.; AERTS, G.; WILLEMS, K. A.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B. Brettanomyces Bruxellensis, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **Brewing Science**., vol. 68, p. 110-121, 2015.

CUTZACH, I.; CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D. Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the aging of sweet fortified wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 47, p. 2837-2846, 1999.

CZERNY, M.; SCHIEBERLE, P. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour-identification and quantitative changes during sourdough fermentation. Journal of Agricultural and **Food Chemistry**, vol. 50, n. 23, p.6835-6840, 2002.

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 ceraus* L.) used in the production of special beers. **FEMS Yeast Research**, vol. 8, p. 1103-1114, 2008.

DAWOUD, E. **Characteristics of enterocateriacea involved in lambic brewing**. 1987. 100 p. (Dissertação) – Katholieke Universiteit te Leuven, Fakulteit der Landbouwwtenschapen, Leuven, 1987.

DAWSON, P. **Vintage beers:** a taster's guide to brews that improve over time. Massachusetts: Storey Publishing, 2014. 149 p.

DE MORA, S. J.; ESCHENBRUCH, R.; KNOWLES, S. J.; SPEDDING, D. J. The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. **Food Microbiol**., vol.3, p.27–32, 1986.

DEHLHOLM, C.; BROCKHOFF, P. B.; MEINERT, L.; AASLYNG, M. D.; BREDIE, W. L. P. Rapid descriptive sensory methods - comparison of free multiple sorting, partial napping, napping, flash profiling and conventional profiling. **Food Quality and Preference**, vol. 26, p. 267-277, 2012.

DELAHUNTY, C. M.; MCCORD, A.; O'NEILL, E. E.; MORRISSEY, P.A. Sensory characterisation of cooked hams by untrained consumers using free-choice profi ling. **Food Quality and Preference**, vol. 8, p. 381 – 388, 1997.

DELCOUR, J. A.; DONDEYNE, P.; TROUSDALE, E. K.; SINGLETON, V. L. The reaction between polyphenols and aldehydes and influence of acetaldehyde on haze formation in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 88, n. 4, p. 234-243, 1982.

DHARMADHIKARI, M. Yeast Autolysis. Missouri State Fruit Experiment Station. **Newsletter: Vineyard & Vintage**, vol. 10, n. 6, p. 1-4, 1995.

DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 331-334, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000300014&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: Jul. 2017.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 71, n. 1-2, p. 307–313, 2000.

DRAGONE, G.; SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Bebidas Alcoólicas**: Ciência e tecnologia. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2010. v.1, cap.2, p.15-48.

ESCUDERO, A.; CAMPO, E.; FARINA, L.; CACHO, J. F.; FERREIRA, V. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 55, p. 4501-4510, 2007.

ESPERANCINI, M.S.T. Mercado brasileiro de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Coord.). **Indústria de Bebidas**: Inovação, gestão e produção. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2011. v.3, cap.14, p.293-322.

ESPITIA-LÓPEZ, J.; LUNA, H.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; VERDE-CALVO, J. R. Identification, quantification, and sensory profile of esters and alcohols of a Mexican red Merlot wine comparing barrel ageing with wood chips, using a multivariable analysis. **Journal of Food Processing and Preservation**, vol. 42, n. 2, e13433, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.13433> Acesso em: Out. 2018.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B.; ROZENTAL, S.; DA SILVA, A. J.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, vol.153, n. 10, p. 647–652, 2002.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analysis Committee**. Analytica-EBC. London: Elsevier, 1963. Method 9.6. Revised October 2000.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analysis Committee**. Analytica-EBC. London: Elsevier, 1963. Method 9.8. Revised October 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Chemical composition and analysis of wood. In:_____ **Wood:** Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter, Berlin, 1984.

FERNANDO, A. M. M. P. **Análise Fatorial para Variáveis Ordinais**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Modelação, Análise de Dados e Sistemas de Apoio à Decisão) - Universidade do Porto, Porto, 2014.

FERREIRA, A. C. S.; BARBE, J. C.; BERTRAND, A. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone: A Key Odorant of the Typical Aroma of Oxidative Aged Port Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, p. 4356-4363, 2003.

FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, vol. 80, p. 1659-1667, 2000.

FEUILLAT, F.; HUBER, F.; KELLER, R. La porosité du bois de chêne (*Quercus robur* L.; *Quercus petraea* Liebl.) utilisé em tonnellerie relation avec la variabilité de quelques caractéristiques physiques et anatomiques du bois. **Revue Française d'Oenologie**, n. 142, p. 5-19, 1993.

FICKERT, B.; SCHIEBERLE, P. Comparative study on the flavour of caramalt and caramalt beer. **Proceedings of the European Brewery Convention Congress**, Cannes, IRL Press: Oxford, p. 71–78, 1999.

FIGUEREDO, F.G,; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F; TORRES, C.M.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.; SILVA J.M.; SANTOS, F.A.; MEDEIROS, C.R.; OLIVEIRA, G. M.; COLARES, A. V., COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; MENEZES, I. R.; SILVA, J. C.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R.; MATIAS, E. F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Bio. Med. Research International**, v. 2013, p. 1- 5, 2013.

FLAVORACTIV LIMITED. **Beer Flavour Handbook** – A Lexicon of Beer Flavour Terms. Version 7. FlavorActiV Limited. Sanderum House Oakley Road, UK. 2015.

FOX, J. **Using the R Commander**: A Point-and-Click Interface or R. Boca Raton FL: Chapman and Hall/CRC Press, 2017.

GARCÍA-MAIQUEZ, E. **Les levures de voile pour l'elaboration des vins de Xèrès**. Application à l'oenologie des progress rècents en microbiologie et en fermentation. Paris, France: (OIV) Organisation International de la Vigne et du Vin., 1988.

GARDNER, R. J.; MCGUINNESS, J. D. Complex phenols in brewing: a critical survey. **MBAA Technical Quarterly**, vol. 14, p. 250–260, 1977. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/acs.jafc.6b03565> Acesso em: Out. 2018.

GIJS, L. CHEVANCE, F.; JERKOVIC, V.; COLLIN, S. How low pH can intensify β-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, p. 5612-5616, 2002.

GRAFF, R. H.; TCHELISTCHEFF, A. The production and aging of wine in small oak cooperage. **Wines and Vines**, vol. 50, p. 26-30, 1969.

HARRIS, R. M. A Primer on Colorful Additives. In: HARRIS, R. M. **Coloring Technology for Plastics**, Plastics Design Library. William Andrew Publishing, 1999, p. 1-12. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/B978-188420778-5.50002-4> Acesso em: Out. 2018.

HASHIMOTO, N. Oxidation of higher alcohols by melanodins in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 78, p. 43-51, 1972.

HASHIMOTO, N.; SHIMAZU, T.; ESHIMA, T. Oxidative degradation of isohumulones in relation to beer flavor . **Report of the Research Laboratory of the Kirin Brewery Company**, vol. 22, p. 1 – 10, 1979.

HAZELWOOD, L. A.; DARAN, J. M.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on Saccharomyces cerevisiae metabolism. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 74, p. 2259–2266, 2008.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. **Malting and Brewing science**. Cambridge, Reino Unido: University Press, 1982. 3ª Edição, 398 p.

INFINITI RESEARCH LIMITED – **Global Beer Market 2016-2020**. Publicado em Junho 2016. Disponível em: <https://www.reportbuyer.com/product/3155262/global-beer-market-2016-2020.html/> Acesso em: Jul. 2016.

ISOE, S.; KATSUMARA, S.; SAKAN, T. The synthesis of damascenone and β-damascone and the possible mechanism of their formation from carotenoids. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 56, p. 1514-1516, 1973.

JAMIESON, A. M.; VAN GHELUWE, J. E. A. Identification of a compound responsible for cardboard flavour in beer. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, vol. 28, p. 192-197, 1970.

JANKOWSKY, I. P.; CHIMELO, J. P.; CAVALCANTE, A. de A.; GALINA, I. C. M.; NAGAMURA, J. C. S. **Madeiras brasileiras**. Caxias do Sul: Spectrum, 1990. 172 p.

JURD, L.; MANNERS, G. D. Wood extractives as models for the development of new types of pest control agents. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 28, p. 183-188, 1980.

KEMP, S. E.; HOLLOWOOD, T.; HORT, J. **Sensory Evaluation**: A Practical Handbook, Wiley-Blackwell. 2009. 208 p.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, vol.23, n. 1, p. 108-112, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019> Acesso em: Out. 2018.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 66, p.10–26, 2004.

KRUGER, L. Yeast metabolism and its effect on flavor: part 1. **Brew Guardian**, vol. 127, p. 24-29, 1998.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlim: VLB Berlin, 2004. 3ª Edição, 1057 p.

LANDAUD, S.; HELINCK, S.; BONNARME, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 77, p. 1191-1205, 2008.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation in quality control. In: LAWLESS, H. T., HEYMANN H. **Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices**. New York: Chapman and Hall , 1998, p. 548 – 584.

LÊ, S., JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, vol. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

LÊ, S.; HUSSON, F. SensoMineR: A Package for Sensory Data Analysis. **Journal of Sensory Studies**, vol. 23, n. 1, p. 14-25, 2008.

LEÃO, M. M. **Influência do termotratamento na composição química da madeira de (*Amburana cearensis*), Cabreúva (*Myroxylon balsamum*) e carvalho (*Quercus* sp.) e o impacto no aroma de uma modelo de cachaça**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais com opção em Tecnologia de Produtos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

LENTZ, M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. **Fermentation**, vol. 4, n. 20, p. 1-13, 2018. Disponível em: < https://doi.org/10.3390/fermentation4010020> Acesso em: Out. 2018.

LERMUSIEAU, G.; NOËL, S.; LIÉGEOIS, C.; COLLIN, S. A nonoxidative pathway for the development of trans-2-nonenal in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, vol. 57, n. 1, p. 29-33, 1999.

LITCHEV, V. Influence of oxidation processo n the development of the taste and falvor of wine distillates. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, p. 31-35, 1989.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Platarum, 1992. 2 v.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA M. Spoilage yeasts in the wine industry. International **Journal of Food Microbiology**, vol. 86, p. 23-50. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0 , 2003.

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

MAGA, J. A. The contribution of wood flavor of alcoholic beverages. **Food Reviews International**, vol. 5, p. 39-99, 1989.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989, 419 p.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V.. A cerveja no brasil: O ministério da agriculta informando e esclarecendo. **Ministério da Agricultura**, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pastapublicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf> Acesso em: Out. 2018.

MARTÍNEZ, P.; PÉREZ, L.; BENÍTEZ, T. Evolution of flor yeast population during the biological aging of Fino Sherry wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, vol. 48, p. 160–168, 1997.

MAXWELL, C. **Scents and Sensibility**: Perfum in Victorian Literary Culture. Oxford University Press: Oxfrod, Reino Unido. 2017. 400 p.

MCGINLEY, C. M.; MCGINLEY, M. A. Odor quantification methods & practices at MSW landfills. Proceedings of the Air & Waste Management Association. **91st Annual Meeting and Exhibition**; Stillwater, MN, USA. 1998. p. 1–12.

MCGREW, D.; CHAMBERS, E. Sensory quality control and assurance of alcoholic beverages through sensory evaluation. In: PIGGOT, J. **Alcoholic beverages:** Sensory evaluation and consumer research. Woodhead Publishing, Oxforde:UK, Cambridge:UK, Philadelphia:USA, New Dehli:India. 2012. cap. 2, p. 24-41

MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasr affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 157, p. 245-250, 2012.

MEILGAARD, M. C. Flavour chemistry of beer. part I: flavour interaction between principal volatiles. **MBAA TQ**, vol. 12, n. 2, p 107-117, 1975.

MEILGAARD, M. C.; DALGLIESH, C. E.; CLAPPERTON, J. F. Beer Flavour Terminology. **Journal of the Institute of Brewing**, vol 85, p. 38-42, 1979.

MEILGAARD, M. C.; REID, D. S.; WYBORSKI, K. A. Reference Standards for Beer Flavor Terminology System. **ASBC Journal**, vol. 40, n. 4, p. 119-128, 1982.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, vol. 33, p. 129-144, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3146> Acesso em: Out. 2018.

MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Chemical profile of aguardente – Brazilian sugar cane alcoholic drink – aged in oak casks. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 28, p. 84-89, 2008.

MOLL, M. **Beers and Coolers**; Springer-Verlag: New York, 1994. p 510.

MONTELEONE. Sensory methods for product development and their application in the alcoholic beverage industry. In: PIGGOT, J. **Alcoholic beverages**: Sensory evaluation and consumer research. Woodhead Publishing, Oxforde:UK, Cambridge:UK, Philadelphia:USA, New Dehli:India. 2012. cap. 4, p. 66-100.

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

MORI, F. A.; MENDES, L. M.; TRUGILHO, P. F.; CARDOSO, M. G. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, 2003.

MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science & Technology**, Colney, v. 9, n. 3, p. 95-101, 1998.

MOURA-NUNES, N.; BRITO, T. C.; FONSECA, N. D.; AGUIAR, P. F.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D.; TORRES, A. G. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, vol. 199, p. 105-113, 2016.

MURRAY, J. M.; DELAHUNTY, C. M.; BAXTER, I. A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, vol. 34, p. 461 – 471, 2001.

Mycologie, Paris, v. 14, p. 127-148, 1997.

NACHENIUS, R. W.; RONSSE, F.; VENDERBOSCH, R. H.; PRINS, W. Biomass Pyrolysis, **Adv. Chem. Eng**., vol. 42, p. 75–139, 2013.

NEVEN, H.; DELVAUX, F.; DERDELINCKX, G. Flavor evolution of top fermented beers. **MBAATechnol Q**, vol. 34, p. 115–118, 1997.

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

NOËL, S.; COLLIN, S. Trans-2-Nonenal degradation products during mashing. **European Brewery Convention**; IRL Press, Oxford University Press: Oxford, U.K., p 483-490, 1995.

NOËL, S.; LIÉGEOIS, C.; LERMUSIEAU, G.; BODART, E.; BADOT, C.; COLLIN, S. Release of Deuterated Nonenal during Beer Aging from Labeled Precursors Synthesized in the Boiling Kettle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 47, p. 4323-4326, 1999.

NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast III. Participation of coenzyme A. **Journal of the Institute of Brewing**, vol.68, p. 398–407, 1962.

O'KENNEDY, R.; THOMES R. D. **Coumarins**: Biology Applications and Mode of Action. New York, NY, USA: John Willey; 1997.

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

OSÓRIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**. São Paulo, v. 40, n. 4, Out./Dez., p. 481-486, 2004.

OSORIO, C.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. C13-Norisoprenoid glucoconjugates from Lulo (Solanum quitoense L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 47, n. 7, p. 1641-1645, 1999.

OVERDIECK, D.; ZICHE, D.; BÖTTCHER-JUNGCLAUS, K. Temperature responses of growth and wood anatomy in Europeanbeech saplings grown in different carbon dioxide concentrations. **Tree Physiologyvol**., vol. 27, p. 261– 268, 2006.

PAGÈS, J. Collection and analysis of perceived product inter-distances using multiple factor analysis: Application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. **Food Quality and Preference**, v. 16 n. 7, p. 642–649, 2005.

PARKER, D. K. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. In: PIGGOT, J. **Alcoholic beverages**: Sensory evaluation and consumer research. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, Reino Unido. 2012, 491 p.

PERRIN, L.; SYMONEAUX, R.; MAITRE, I.; ASSELIN, C.; JOURJON, F.; PAGES, J. Comparison of three sensory methods for use with the NappingR procedure: Case of ten wines from Loire Valley. **Food Quality and Preference**, vol. 19, p. 1–11, 2008.

PICKERELL, A.T.W.; HWANG, A.; AXCELL, B.C. Impact of yeast-handling procedures on beer flavour development during fermentation. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, vol. 49, p. 87–92, 1991.

PIGGOT, J. **Alcoholic beverages**: Sensory evaluation and consumer research. Woodhead Publishing, Oxforde:UK, Cambridge:UK, Philadelphia:USA, New Dehli:India. 2012. 502 p.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**. ,vol. 98, p. 1937-1949, 2014.

POISSON, L.; SCHIEBERLE, P. Characterization of the Key Aroma Compounds in an American Bourbon Whisky by Quantitative Measurements, Aroma Recombination, and Omission Studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 56, n. 14, p 5820–5826, 2008.

POLGE, H. Production de chênes de qualité em France. **Revue Forestière Française**, Marcelle. Spec., n. 36, p 34-48, 1984.

PONTALLIER, P. **Recherche sur les conditions d'elevage des vins rouges: Role des mecanismes oxydatifs**. 1981. 100 p. Thèse (Doct-Ing) – Université Bordeaux II, Bordeaus, 1981.

PONTALLIER, P.; SALAGOITY-AUGUSTE, M. H.; RIBEREAU-GAYON, P. Interventions du bois de chêne das l'évolution des vins rouges éleves en barriques. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Tolence, n. 16, p. 45-61, 1982.

PUECH, J. L. Extraction and evolution of lignin products in armagnac matured in oak. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n. 2, p. 111-114, 1981.

PUECH, J. L. Characteristics of oak wood and biochemical aspects of armagnac aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, vol. 35, p. 77-81, 1984.

QIAO, Y.; XIE, B. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; FAN, G.; YAO, X. L.; PAN, S. Y. Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jinchen Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. **Molecules**, vol. 13, p. 1333-1344, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules13061333> Acesso em: Out. 2018.

QUAIN, D. E.; DUFFIELD, M. L. A metabolic function for higher alcohol production by yeast. **Proceedings of the 21st Congress of the European Brewery Convention**. Madrid, p. 417-424, 1985.

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

RAMIREZ-RAMIREZ, G. **Étude de la sorption des composés d'arôme du vin par le bois de chêne en système modèle d'élevage en fûts**. 2002. 173 p. Tese (Doutorado em Enologia) –Université de Bourgogne, Bourgonha, França. 2002.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms in whiskey maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 32, n. 4, p.283-289, 1981.

REED, D. R.; KNAAPILA, A. Genetics of Taste and Smell: Poisons and Pleasures. **Prog Mol Biol Transl Sci.**, vol. 94, p. 213–240, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375003-7.00008-X> Acesso em: Out. 2018.

RIERA, C. E.; VOGEL, H.; SIMON, S. A.; LE COUTRE, J. Artificial sweeteners and salts producing a metallic taste sensation activate TRPV1 receptors. **The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, vol. 293, n. 2, p. 626-634, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00286.2007> Acesso em: Out. 2018.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA P.R.B.; OLIVEIRA C.S.M.; JÚNIOR R.R.; VALÉRIO H.M.; BRAMDI I.V.; OLIVEIRA D.A. Antibacterial activity of taninis from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, p.1-5, 2014.

RUDMAN, P. The causes of natural durability in timber. IX. The antifungal activity of heartwood extractives in a wood substrate. **Holzforschung**, vol. 16, p. 74-77, 1962.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **J Chromatogr A.**, vol. 1190, p. 342-349, 2008.

SAISON, D.; DE SCHUTTER, D. P.; UYTTENHIVE, B.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavor of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, vol. 114, p. 1206–1215, 2009.

SAKITA, M. N.; VALLILO, M. I. Estudos fitoquímicos preliminares em espécies florestais do Parque Estadual do Morro do Diabo, Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v.2, n.2, p.215-226, 1990.

SÁNCHEZ-IGLESIAS, M.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERS, M.; GONZÁLEZ-HUERTA, C. Effect of Micro-Oxygenation and Wood Type on the Phenolic Composition and Color of an Aged Red Wine. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 57, p. 11498–11509, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf902173d> Acesso em: Out. 2018.

SAUCIER, C.; BOURGEOIS, G.; VITRY, C.; ROUX, D.; GLORIES, Y. Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a modelfor coloidal state of wine polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 45, n. 4, p. 1045-1049, 1997.

SCHIMWEL, J. L. the genus pediococcus. American Brewers, Manchesterm, v. 80, n. 57, p. 27-29, 1947.

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.

SCHOLTES, C.; NIZET, S.; COLLIN, S. How Sotolon Can Impart a Madeira Off-Flavor to Aged Beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 63, p. 2886−2892, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf505953u>. Acesso em: Out. 2018.

SIERA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. The methanogenic toxicity of wood resin constituents. **Biological Wastes**, vol. 33, p.211-226, 1990.

SILVA, A. A.; DO NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Identificação de extratos etanólicos de madeiras utilizando seu espectro eletrônico de absorção e análise multivariada. **Química Nova**, vol. 35, n. 3, p. 563-566, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-0422012000300023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em Set. 2018.

SINGLETON, V. L. Maturation of wines and spirits – comparaisons, facts, and hypotheses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 1, p. 98-115, 1995.

SINGLETON, V. L. **Some aspects of the wooden containers as a factoring wine maturation in "Chemistry of Wine Making".** Washington: ACS, 1974. 311 p. (ACS Series, 137)

SPIESS, S. A cor da cerveja. **O caneco**, 2016. Disponível em: < https://www.ocaneco.com.br/cor-da-cerveja/> Acesso em: Out. 2018.

SPITAELS, F.; WIENNE, A. D.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H. M.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **Plos One**, vol. 9, e95384, 2014. Disponível em: < https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384> Acesso em: Out. 2018.

STAFFORD, R. A. Yeast Physical (Shear) Stress: The Engineering Perspective. In: SMART, K. **Brewing Yeast Fermentation Performance** – Second edition. Blackwell Science: Oxford, Reino Unido, 2003. 2ª Edição. 321 p.

STEPHENSON, W. H.; BAMFORTH, C. W. The impact of lightstruck and stale character in beers on their perceived quality: A consumer study. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 108, p.406–409, 2002.

STERCKX, F. L.; SAISON, D.; DELVAUX, F. R. Wood Aging of Beer. Part I: Influence on Beer Flavor and Monophenol Concentrations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, vol. 70, n. 1, p. 55-61, 2012.

STEWART, D. **The chemistry of essential oils made simple**: God's love manifest in molecules. Care Publications: Marble Hill, EUA. 2005. 625 p.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: A review. **Food Chemistry**, vol. 102(1), p. 10-21, 2007

SULSER, H.; DEPIZZOL, J.; BÜCHI, W. A probable flavoring principle in vegetable-protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, vol. 32, p. 611−615, 1967.

TAKAHASHI, K.; TADENUMA, M.; SATO, S. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, a burnt flavoring compound from aged sake. **Agriculture and Biological Chemistry**, vol. 40, p. 325−330, 1976.

THURSTON, P. A.; TUBB, R. S. Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavors – a simple method for determining phenols in wort and beer. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 87, p. 177-179, 1981.

TRESSL, R.; FRIESE, L.; FENDESACK, F.; KÖPPLER, H. Studies of the volatile composition of hops during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 26, p. 1426-1430, 1978.

TSCHOPE, E.C. **Microcervejarias e Cervejarias**: A História, a Arte e a Tecnologia. 1 ed. São Paulo: Editora Aden, 2001. 223p.

VAN OEVELEN, D.; L'ESCAILLE, F.; VERACHTERT, H. Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 82, p. 322-326, 1976.

VAN OEVELEN, D.; SPAEPEN, M.; TIMMERMANS, P.; VERACHTERT, H. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 83, p. 356–360, 1977.

VANBENDEN, N.; SAISON, D.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Decrease of 4-Vinylguaiacol during Beer Aging and Formation of Apocynol and Vanillin in Beer. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 56, p. 11983–11988, 2008.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; DAENEN, L.; VERSTREPEN, K. J.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Furfuryl ethyl ether: Important aging flavor and a new marker for the storage conditions of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 1661–1668, 2004b.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 6755–6764, 2004a.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, vol. 95, p.357-381, 2006.

VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F.; DAENEN, L.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, vol. 103, p. 404–412, 2007.

VARELA, P.; ARES, G. Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. **Food Research International**, vol. 48, p. 893-908, 2012.

VIVAS, N. **Manuel de tonnellerie**. Paris: Editions Féret, 1998. 155p.

VIVAS, N.; GLORIES, Y. Étude de la flore fungique du chêne (*Quercus* sp.) caracteristique du séchage naturel des bois destinés à la tonnellerie. **Cryptogamie Mycologie**, v. 14, p. 127-148, 1997.

WACKERBAUER, K.; KRAMER, P. Bayerische Weizenbierseine Alternative. **Brauwelt**, vol. 18, p. 758–762, 1982a.

WACKERBAUER, K.; KRAMER, P. Phenolische Aromastoffe in Bier. **Brauwelt**, vol. 18, p. 758–762, 1982b.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. 350p.

WARING, D. R. Heterocyclic Dyes and Pigments. In: KATRITZKY, A. R.; REED, C. W. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**, Pergamon, 1984, p. 317-346. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00012-6> Acesso em: Out. 2018.

WEI, T.; SIMKO, V. **R package "corrplot"**: Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84), 2017. Disponível em: https://github.com/taiyun/corrplot> Acesso em: Out. 2018.

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

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages – a review. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 82, n. 2, p. 84-92, 1976.

WILLIAMS, E.J. Experimental designs for the estimation of residual effects of treatments. Austral. Australian **Journal of Scientific Research**, vol. 2, p. 149-168, 1949.

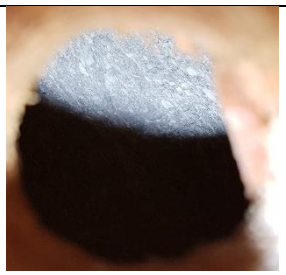
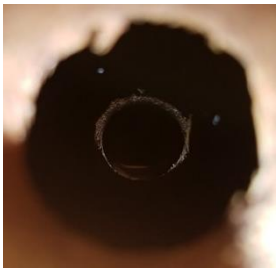
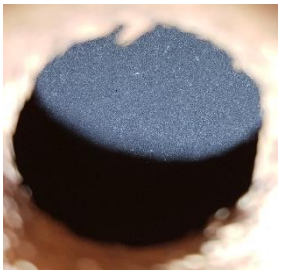
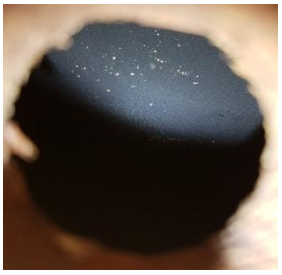
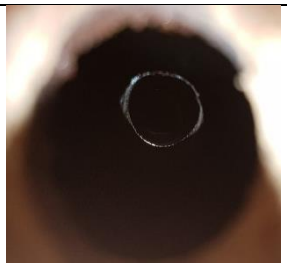
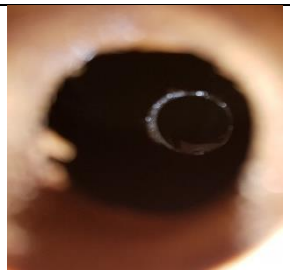
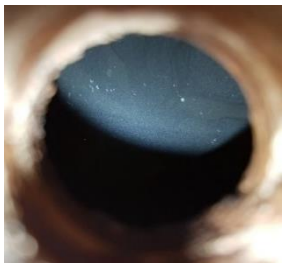
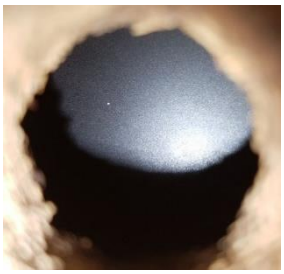
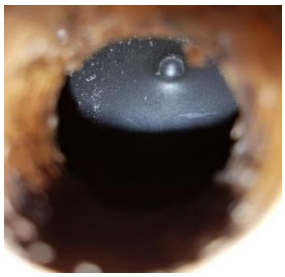
WYLER, P.; ANGELONI, L. H. P.; ALCARDE, A. R.; CRUZ, S. H. Effect of oak wood on the quality of beer. **J. Inst. Brew.**, vol. 121, p. 62–69, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.190> Acesso em: Out. 2018.

YANG, Z.; KINOSHITA, T.; TANIDA, A.; SAYAMA, H.; MORITA, A.; WATANABE, N. Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursos in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour. **Food Chemistry**, vol 114, p. 289-294, 2009.

ZHUANG, S.; SHETTY, R.; HANSEN, M.; FROMBERG, A.; HANSEN, P. B.; HOBLEY, T. J. Brewing with 100 % unmalted grains: barley, wheat, oat and rye. **European Food Research and Technology**, vol. 243, n. 3, p. 447-454, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Fotografia obtida através do orifício de preenchimento do barril (batoque) evidenciando a superfície da cerveja sob envelhecimento em duplicatas de barris de diferentes madeiras.

	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Amb 1				
Amb 2				
Cabr 1				
Cabr 2				
Carv Am 1				
Carv Am 2				

APÊNDICE B. Lista de atributos e estímulos apresentados durante treinamento dos avaliadores para análise sensorial de cervejas envelhecidas em barris de diferente madeiras.

Grupo de aroma	Atributo	Característica	Composto	Estímulo olfativo	Referência
Adocicados	Chocolate	Chocolate ao leite, cacau	2-acetilfurano	5g de chocolate ao leite picado	f
	Baunilha	Essência de baunilha, fava de baunilha	Vanilina	1 fava de baunilha	-
	Mel	Mel, favo de mel	Etil-fenil-acetato	5 mL de mel silvestre	a, b
	Caramelo	Caramelo	3-Etil-2,5-dimetilpirazina	5 mL caramelo	a, c
	Café	Café	2-Etil-3,5(6)-dimetilpirazina	5g de grão de café inteiros	f
	Tabaco	Tabaco, fumo de corda		5g de fumo de corda	-
Fenólicos	Medicinal	Band-aid	4-vinil guaiacol	3 curativos band-aid	a, b, c
	Fenólico	Aroma fenólico, couro	etil-fenol	Cápsula FlavorActiV	b
	Couro	Couro, fenólico, sela de cavalo		Tira de couro de 12cm	-
	Amêndoa	Amendoado, marzipan	Benzaldeído	4 amêndoas salgadas	a, b, c
	Cumaru	Baunilha, amburana, adocicado		2 semestes de cumaru	-
	Amadeirado	Madeira, madeira verde	α-ionona	3 g de cubos de 1cm3 de castanheira	e
Defeitos (*off-falvors*)	Sulfuroso	Sulfuroso, ovo estragado	Ácido sulfídrico	Cápsula FlavorActiV	a, b
	Manteiga	Amanteigado	Butanediona	1 g de manteiga	c
	Isovalérico	Lúpulo velho, queijo	Ácido isovalérico	2 g de lúpulo velho (3 anos)	b
	Ácido acético	Ácido, avinagrado	Ácido acético	Solução ácido acético glacial (Dinâmica) 1000 ppm	a, b
	Papelão	Papelão velho	Trans-2-nonenal	5 pedaços molhados de papelão de 6,25 cm^2	a, b, c, f
	Plástico	Copo de plástico descartável	Estireno	Cápsula FlavorActiV	b
	Alcoólico	Vodka, etanol	Etanol	30 mL de Etanol P.A. (LSChemicals)	c
(continuação...)	DMS	Milho verde enlatado	Dimetilsulfeto	50 mL de água de milho	a, b, c

				verde enlatado	
Matérias primas	Maltado	Cevada, malte, grãos	Maltol	5 g mistura de malte Pilsen e malte Special B	f
	Lúpulo	Lúpulo		2 g lúpulo Target fresco	-
Aromas de fermentação	Frutas vermelhas	Cereja em calda, cereja fresca		10 g de cereja em calda	-
	Frutas secas	Ameixa, uva passa, fruta-passa		3 ameixas, 2 uvas passas, 2 figos	a, b, c
	Acetaldeído	Solvente, maçã verde	Acetaldeído	solução acetaldeído (Sigma) 20 ppm	-
	Fermento	Aroma de fermentaçã, fermento		5g de fermento US-05 (Fermentis) liofilizado	-
	Acetato de etila	Verniz, acetona	Acetato de etila	solução acetato etila (Sigma) 20 ppm	a, b, c
Especiarias	Noz moscada	Noz moscada, especiaria		2g de noz moscada moída	-
	Alcaçuz	Alcaçuz, bala de alcaçuz		2g de caule de alcaçuz	c
	Jasmim	Floral, flor doce	Etil hidrocinamato	5g de flores de jasmim secas	d
	Cardamomo	Cardamomo		5g de cardamomo seco	-
	Canela	Canela	Cinamaldeído	3 canelas em pau	e
	Cravo	Cravo	Eugenol	5g de cravo da Índia	e
	Pimenta	Pimenta	Pimenta, condimento	2 g de mistura de Pimenta rosa, pimenta do reino, pimenta branca	a, b, c
	Especiarias	Cravo, especiarias, funcho		2 g mistura de cravo e anis	-
Terrosos	Terroso	Terra molhada, cogumelos	3-etil fenchol	800 mg cogumelos portobello partidos ao meio + 500 mg madeira úmida	c
Herbáceos/ Vegetais	Herbáceo	Vegetal, grama, ervas	cis-3-hexen-1-ol	2 g de mistura de alecrim, tomilho, orégano, erva cidreira e grama cortada	e
	Chá	Ervas para chá, adocicado	1-hexanol	1 sachê chá Twining's Breakfast Tea	e
(continuação...)	Orégano	Folha de orégano		5g de folha de orégano	-

	fresco, orégano seco	seco	
Menta	Folha de menta, bala mentolada	5g de folha de mentolada	c
Alecrim	Folha de alecrim fresco, alecrim seco	5g de folha de alecrim seco	-
Manjericão	Folha de manjericão fresco, manjericão seco	5g de folha de manjericão seco	-
Cânfora	Cânfora, VIC VaporHub	1 pedra de cânfora	-

a – Meilgaard, Dalgliesh e Clapperton (1979); b – Flavoractiv (2015); c – Campo et al. (2010); d – Ferreira, Lopez e Cacho (2000); e – Escudero et al. (2007); f – Parker (2012)

APÊNDICE C. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado aos provadores anteriormente à análise sensorial realizada.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O TCLE é o documento básico e fundamental do protocolo e da pesquisa com ética. É a fonte de esclarecimento que permite ao sujeito da pesquisa tomar sua decisão, de participar do projeto como voluntário, de forma justa e sem constrangimentos. É a proteção legal e moral do pesquisador, posto que é a manifestação clara de concordância com a participação na pesquisa. Deve ser assinado pelo responsável da pesquisa e pelo voluntário, ficando uma cópia para cada um.

Título da pesquisa: Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras.

Objetivos da pesquisa: Caracterizar sensorialmente o perfil de uma cerveja do estilo *barley wine* envelhecida em barris de carvalho, amburana e Cabreúva e buscar as características que as diferenciem da cerveja não envelhecida.

Procedimentos que serão utilizados: Uma cerveja do estilo *barley wine*, foi envelhecida em barris de diferentes madeiras: carvalho americano, amburana e cabreúva. Após o envelhecimento, as amostras passaram por análises química. Nesta etapa da pesquisa, será realizada a análise *Napping* associada ao *Ultraflash profile* na qual serão oferecidas 4 amostras contendo 20 mililitros de cada cerveja (uma de cada tratamento), a 10,5 %v/v de teor alcoólico. O painel deverá listar palavras que identificam as semelhanças e diferenças nos atributos sensoriais relacionados com aparência, aroma, sabor e textura. Após a análise individual das amostras, será realizada a discussão coletiva para esclarecer os termos concedidos pelos provadores. Nas 3 sessões seguintes, 4 amostras serão reapresentadas ao painel (uma de cada tratamento mais a cerveja não envelhecida em madeira), e este deverá preencher uma posicionar as taças sobre uma folha A3 em branco segundo critério de maior proximidade quanto mais semelhança houver entre as amostras e maior distância quanto mais diferença, e uma ficha com a avaliação das principais características para descrição de cada uma das amostras, segundo critério do próprio avaliador, quanto aos aspectos visual, olfativo e gustatório abordados durante o treianmento.

Riscos possíveis e benefícios esperados: nesta pesquisa, os riscos relacionados ao consumo de bebidas alcoólicas existem e serão minimizados, pois os participantes serão aconselhados a não consumir, ou seja, não deglutir o produto durante a sessão de análise sensorial, visto que nenhuma quantidade de etanol no sangue é permitida pela legislação nacional para a condução de veículos. O benefício da pesquisa será obtenção de resultados práticos e realistas que contribuam para o desenvolvimento do perfil sensorial de cerveja envelhecida. A pesquisa será acompanhada integralmente pelo seu responsável, o qual garante total assistência ao sujeito durante a realização da pesquisa.

Fica garantido o direito de esclarecimento de qualquer dúvida ou curiosidade do voluntário, quer seja antes, durante ou após a realização da pesquisa.

Fica garantido aos sujeitos da pesquisa o direito de recusar a participar em qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer penalidade.

Fica garantido o sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam provocar constrangimentos ou prejuízos ao voluntário. Os dados serão publicados e apresentados em reuniões científicas sem identificação dos voluntários.

Conforme já citado há riscos, porém se não houver a deglutição do produto, esses serão minimizados.

Uma copia do TCLE será entregue ao voluntário.

- Ciente do compromisso assumido, subscrevo-me a seguir:
- Nome (completo) _____
- Assinatura _____

Piracicaba, _____de_____ de 2018.

Giovanni Casagrande Silvello - Pesquisadora responsável
Mestrando na Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - Setor de Açúcar e Álcool
Av. Pádua Dias, 11 – CP 9 – 13418-900 – Piracicaba-SP Fone: (19) 3429-4198
E-mail: giovanni.silvello@usp.br
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos na USALQ/USP (CEP)
Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Av. Pádua Dias, 11 – CP 9 – 13418-900 – Piracicaba-SP Fone: (19) 3429-4400
E-mail: cep.esalq@usp.br

ANEXOS

ANEXO A. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética na Pesquisa (CEP) de aprovação das análises sensoriais desenvolvidas durante este projeto.

USP - ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras
Pesquisador: GIOVANNI CASAGRANDE SILVELLO
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 81265417.0.0000.5395
Instituição Proponente: "Escola Superior de Agricultura ""Luiz de Queiroz"" - ESALQ da Universidade
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.923.716

Apresentação do Projeto:
Este protocolo de pesquisa foi aprovado em 28/03/2018.
A Emenda ora proposta refere-se a alteração de metodologia, da análise de Flash-profiling para a metodologia Ultraflash profile associada ao Napping (mapeamento projetivo). A modificação visa à exploração da percepção dos avaliadores de forma mais holística por empregar métricas que não dependem de escalas, mas sim da disposição espacial (distância) entre as amostras sobre uma superfície.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Pesquisa relevante para a área de Tecnologia de Bebidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os documentos obrigatórios estão presentes e são adequados.

Recomendações:
Após a aprovação os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios parciais (no mínimo um a cada 12 meses) ou final (ao término da pesquisa). Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP. Intercorrências ou eventos adversos devem ser relatados ao CEP por meio da PB. Eventuais mudanças pretendidas no protocolo devem ser comunicadas como emendas ao CEP por meio da PB.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
A emenda ao projeto pode ser aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Avenida Pádua Dias,11 Caixa Postal 9
Bairro: São Dimas **CEP:** 13.418-900
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)3429-4400 **E-mail:** cep.esalq@usp.br

USP - ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" DA UNIVERSIDADE

PIRACICABA, 27 de Setembro de 2018

Assinado por:
Sandra Helena da Cruz
(Coordenador(a))