



**PEDRO JOEL DA  
COSTA CORREIA**

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE *DRY-HOPPING* EM  
CONTEXTO MICROCERVEJEIRO**





**PEDRO JOEL DA  
COSTA CORREIA**

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE *DRY-HOPPING* EM  
CONTEXTO MICROCERVEJEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, co-orientação do Professor João Manuel Costa Araújo Pereira Coutinho, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e supervisão empresarial do Engenheiro Nicolas Jean-Louis Billard, da empresa Essência D'Alma, Lda.



Dedico este trabalho à minha família e amigos por todo o apoio.



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Carlos Manuel Santos da Silva**  
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier**  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Elisabete Verde Martins Coelho**  
Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer à Universidade de Aveiro e à empresa Essência D'Alma, Lda. pela oportunidade de realizar esta dissertação em ambiente empresarial. Foi uma experiência que me permitiu alargar conhecimentos e que contribuiu bastante para o meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço à Doutora Elisabete Coelho pela orientação, e ao Prof. Manuel Coimbra, por todo o apoio que despenderam ao longo desta dissertação.

Quero também agradecer a todo o *staff* da empresa Essência D'Alma, Lda. por todo o conhecimento transmitido, mas essencialmente por todas as horas de trabalho bem passadas e por todas as amizades que ali se criaram.

Por último, agradecer à minha família e amigos, que estiveram presentes desde a primeira palavra escrita até ao último ponto final desta dissertação, foram sempre capazes de me compreender e apoiar.



## palavras-chave

Cerveja, Lúpulo, *Dry-hopping*, Compostos voláteis, Aroma

## resumo

A realização desta dissertação foi efetuada em ambiente empresarial, na empresa Essência D'Alma, Lda., proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia. O objetivo do trabalho foi a otimização do processo de *dry-hopping*, que consiste na adição de lúpulo da variedade de aroma, ou seus produtos, à cerveja de forma a conferir sabor e aroma. Estes produtos são adicionados no final ou após a ebulição, nos vasos de fermentação, de maturação ou em barris, de forma a ocorrer a dissolução de compostos de aroma. Este passo é distinto e posterior à fase de adição de lúpulos de amargor durante a ebulição do mosto, que têm como objetivo conferir propriedades conservantes e amargor, devido à presença de  $\alpha$ -ácidos. Este processo é relevante para produzir cervejas do estilo *India Pale Ale* (IPA) e cervejas de edição limitada, como a *German Pilsner*.

Na empresa, o processo de *dry-hopping* é realizado com o auxílio de uma coluna de recirculação. De forma a avaliar a eficácia deste método foram realizados testes em produção de cerveja IPA e *German Pilsner*. A análise da composição volátil de ambas as cervejas foi feita por microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME/GC-MS). Foram também avaliadas as características organolépticas através de uma prova sensorial realizada na empresa à cerveja IPA.

Para o lúpulo utilizado no *dry-hopping* da cerveja do estilo *German Pilsner* a análise da composição volátil permitiu determinar a quantidade relativa de 12 compostos, grande parte monoterpenóis, enquanto que para a cerveja foram determinados 8 compostos, na sua maioria monoterpenóis. Foi também possível verificar uma baixa transferência de compostos voláteis de aroma para o produto final e uma elevada abundância destes compostos no lúpulo usado no final do processo. Deste modo, concluiu-se que o processo foi ineficiente, que poderá ter sido resultado de um tempo de residência da cerveja baixo para a razão de lúpulo utilizado por litro de cerveja de 3,2 g/L.

A análise da composição volátil realizada à cerveja do estilo IPA permitiu determinar 11 compostos, sendo na sua maioria monoterpenos e monoterpenóis. Verifica-se também que grande parte destes compostos apresenta a sua abundância máxima nas primeiras 4,5 horas do processo, decaindo nas horas seguintes. Para além disto, e juntamente com a análise organoléptica, verificou-se um aumento indesejável da intensidade de um aroma resinoso após o início do processo, bem como um aumento do amargor e do prolongamento do sabor amargo após o fim do processo. Assim conclui-se que existe um tempo excessivo de *dry-hopping* que não é benéfico para as características organolépticas do produto final quando existe uma razão de 2,7 g/L de lúpulo utilizado por litro de cerveja.

A redução do tempo de *dry-hopping* para um tempo ótimo de 4,5 horas para a cerveja IPA, e a reutilização do lúpulo utilizado trariam para a empresa benefícios a nível económico e ambiental, sendo estas as melhorias a implementar no processo de produção.



**keywords**

Beer, Hop, Dry-Hopping, Aroma compounds, Aroma

**abstract**

This dissertation was conducted in a business environment at Essência D'Alma, Lda., owner and producer of the craft beer brand Vadia. The objective was to optimize the dry-hopping process, which consists of adding hops of aroma varieties, or its products, to beer in order to give flavor and taste. These products are added at the end or after boiling in fermentation vessels, maturation vessels or barrels in order to dissolve aroma compounds. This step is different from and after the addition of bitterness hops during boiling wort, which aims to confer preservative and bitterness properties due to the presence of  $\alpha$ -acids. This process is relevant for producing India Pale Ale (IPA) beers and limited edition beers, like German Pilsner.

In the company the dry-hopping process is performed with a recirculation column. In order to evaluate the effectiveness of this method, tests were conducted on IPA and German Pilsner beer production. Analysis of the volatile composition of both beers was performed by solid phase microextraction and mass spectrometry gas chromatography analysis (HS-SPME/GC-MS). The organoleptic characteristics were also evaluated through a sensory test performed in the company to IPA beer.

For the hops used in dry-hopping of German Pilsner beer the analysis of volatile composition allowed to determine about 12 compounds, mostly monoterpenols, while for beer about 8 compounds were determined, mostly monoterpenols. It was also possible to verify low transfer of volatile aroma compounds to the final product and high abundance of these compounds in the hop used at the end of the process. Thus, it is concluded that the process is inefficient, which may be the result of a short residence time of beer, for the hop ratio used per liter of beer of 3,2 g/L.

The analysis of the volatile composition performed on IPA beer allowed to determine about 11 compounds, mostly monoterpenes and monoterpenols. It is also found that most of these compounds show their maximum abundance in the first 4,5 hours of the process and decay in the following hours. In addition, with the organoleptic analysis, it was found an increase in the intensity of a resinous aroma after the start of the process, as well as an increase in the presence of bitterness and prolongation of the bitter taste after the end of the process. It is possible to conclude that there is an excessive dry-hopping time that is not beneficial to the organoleptic characteristics of the final product when there is a 2,7 g/L hop ratio used per liter of beer.

Reducing the dry-hopping time to an optimal 4,5 hours and reusing the hops would bring economic and environmental benefits to the company, and these improvements should be implemented in the production process.



# Índice

Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Tabelas .....	xix
1. Introdução .....	1
1.1. Estrutura da dissertação.....	1
1.2. Enquadramento e objetivos do trabalho .....	1
1.3. Empresa .....	2
2. Revisão bibliográfica .....	4
2.1. Lúpulo.....	4
2.2. Características da plantação de Lúpulo.....	5
2.3. Produção mundial de Lúpulo .....	6
2.4. Principais utilizações do Lúpulo.....	9
2.5. Produtos derivados de Lúpulo .....	12
2.6. Composição do Lúpulo.....	13
2.7. Composição volátil da cerveja .....	17
2.8. <i>Dry-hopping</i> .....	20
2.8.1 Relevância do <i>dry-hopping</i> para o processo cervejeiro .....	20
2.8.2. Métodos de <i>dry-hopping</i> .....	22
3. Materiais e Métodos .....	24
3.1. Realização de <i>dry-hopping</i> .....	24
3.2. Análise da composição volátil do lúpulo e da cerveja.....	26
3.3. Análise sensorial.....	29
4. Apresentação e discussão de resultados .....	31
4.1. Análise da composição volátil.....	31
4.1.1. Lúpulo <i>Simcoe</i> .....	31

4.1.2. Cerveja <i>German Pilsner</i> .....	34
4.1.3. Cerveja <i>India Pale Ale (IPA)</i> .....	39
4.2. Análise sensorial.....	46
5. Conclusão .....	52
Bibliografia.....	54



# Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da flor de lúpulo.....	5
Figura 2 – Produção mundial de lúpulo.....	8
Figura 3 - Estruturas de $\alpha$ -ácidos e $\beta$ -ácidos.....	14
Figura 4 – Esquema da reação de isomerização de $\alpha$ -ácidos.....	15
Figura 5 – Classificação dos principais compostos presentes nos óleos essenciais de lúpulo.....	16
Figura 6 – Estrutura química do mirceno, $\beta$ -cariofileno e humuleno .....	17
Figura 7 – Reação de isomerização enzimática do geraniol a linalol .....	18
Figura 8 – Montagem do equipamento de dry-hopping.....	24
Figura 9 – Montagem experimental do processo de SPME com a fibra exposta .	27
Figura 10 – Questionário de prova utilizado na análise sensorial da cerveja IPA	30
Figura 11 - Cromatograma da amostra de lúpulo fresco .....	32
Figura 12 - Cromatograma da amostra de lúpulo usado .....	32
Figura 13 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas amostras de lúpulo.....	33
Figura 14 - Cromatograma da réplica 1 da amostra cerveja German Pilsner sem dry-hopping .....	34
Figura 15 - Cromatografia da réplica 2 da amostra cerveja German Pilsner sem dry-hopping .....	35
Figura 16 - Cromatograma da réplica 1 da amostra cerveja German Pilsner com dry-hopping .....	36
Figura 17 - Cromatografia da réplica 2 da amostra cerveja German Pilsner com dry-hopping .....	36
Figura 18 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas amostras da cerveja German Pilsner.....	37
Figura 19 – Cromatograma da amostra de cerveja IPA antes do início de dry-hopping.....	40
Figura 20 - Cromatograma da amostra da cerveja IPA 2 horas após o início do processo de dry-hopping.....	40
Figura 21 – Cromatograma da amostra de cerveja IPA 4,5 horas após o início de dry-hopping .....	41

Figura 22 - Cromatograma da amostra de cerveja IPA 6,75 horas após o início de dry-hopping, com respetiva integração .....	41
Figura 23 - Cromatograma da amostra de cerveja IPA 10,75 horas após o início de dry-hopping, com respetiva integração .....	41
Figura 24 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas várias amostras da cerveja IPA .....	43
Figura 25 - Variação da abundância dos compostos voláteis ao longo do dry-hopping .....	44

# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de variedades de lúpulos de amargor e de aroma.....	9
Tabela 2 – Comparação entre os produtos de lúpulo mais utilizados .....	12
Tabela 3 – Concentração dos principais componentes da lúpulo .....	14
Tabela 4 – Estrutura, descritores de aroma e limites de percepção sensorial de alguns compostos voláteis de aroma presentes na cerveja .....	19
Tabela 5 – Fase estacionária da fibra de SPME utilizada .....	27
Tabela 6 – Identificação das amostras em função do tempo de dry-hopping .....	29
Tabela 7 - Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de lúpulo em pellets, do seu tempo de retenção e abundância .....	31
Tabela 8 – Identificação de compostos voláteis presentes na amostra de cerveja German Pilsner sem dry-hopping do seu tempo de retenção e abundância .....	34
Tabela 9 - Identificação de compostos voláteis presentes na amostra de cerveja German Pilsner com dry-hopping, do seu tempo de retenção e abundância.....	35
Tabela 10 – Descritores de aroma dos compostos voláteis presentes nas amostras de lúpulo e cerveja German Pilsner .....	38
Tabela 11 – Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja IPA antes do início do dry-hopping e após 2 e 4,5 horas após o início do mesmo, tempo de retenção e abundância.....	39
Tabela 12 - Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja IPA 6,75 e 10,75 horas após o início do dry-hopping, tempo de retenção e abundância.....	39
Tabela 13 – Descritores de aroma dos compostos voláteis presentes nas amostras analisadas .....	46
Tabela 14 – Provas sensoriais à cerveja IPA durante a fase de maturação após dry-hopping .....	46
Tabela 15 – Identificação das amostras em função do tempo de dry-hopping ....	48
Tabela 16 – Resultados do questionário de prova realizado por especialistas ....	48
Tabela 17 - Resultados do questionário de prova realizado por consumidores regulares .....	50



# 1. Introdução

## 1.1. Estrutura da dissertação

A dissertação realizada encontra-se dividida em cinco capítulos, que por sua vez encontram-se divididos por secções. No primeiro capítulo é realizada um pequeno enquadramento ao tema a explorar durante este trabalho, bem como a definição dos principais objetivos a desenvolver. Aqui, encontra-se também um breve resumo sobre a empresa na qual foi realizada esta dissertação. No segundo capítulo está apresentada a revisão bibliográfica do trabalho a realizar. Está presente uma caracterização global do lúpulo e as suas principais funções no decurso do processo cervejeiro, para além da definição de *dry-hopping*, variáveis que influenciam o processo e métodos que se encontram disponíveis. No terceiro capítulo realiza-se a apresentação dos materiais e métodos utilizados ao longo da realização desta dissertação. No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos questionários das provas sensoriais e das análises de compostos voláteis realizadas às amostras recolhidas durante a realização do trabalho. Este capítulo está dividido em algumas secções de acordo com os testes realizados, bem como de acordo com as amostras onde foram realizados os testes. Por último, no quinto capítulo estão presentes as conclusões do trabalho realizado, bem como as considerações finais.

## 1.2. Enquadramento e objetivos do trabalho

A crescente procura por cerveja artesanal associada a uma mudança de preferência por parte dos consumidores, que opta por cervejas cada vez mais aromáticas e intensas a nível de sabor, estão a impulsionar o crescimento sustentável da plantação de lúpulo. Este é uma matéria-prima essencial para a produção cervejeira que é capaz de conferir a este produto uma série de qualidades organoléticas, sendo responsável por conferir ao produto final amargor, aroma, sabor, e ainda por ser um conservante natural. [1]

De modo a ir ao encontro das necessidades do consumidor, as cervejeiras a nível mundial reintroduziram nos seus processos de produção o *dry-hopping*, que

consiste na adição de lúpulo, ou dos seus produtos, nos vasos de fermentação, de maturação ou em barris, de forma a ocorrer a dissolução de compostos de aroma com o objetivo de valorizar o produto final.

Com o crescimento do mercado para as cervejas aromáticas, a empresa Essência D'Alma, Lda., proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia, decidiu introduzir na sua gama uma cerveja do estilo *India Pale Ale* (IPA) caracterizado por ser bastante amargo e extremamente aromático. Para tal, a empresa teve que introduzir no seu processo de produção o *dry-hopping*, que é realizado com o auxílio de uma coluna de recirculação. Como tal, a realização desta dissertação tem como principal objetivo a otimização do processo de *dry-hopping*.

### 1.3. Empresa

Fundada em outubro de 2010, a empresa Essência D'Alma, Lda. é detentora da marca de cerveja artesanal Vadia. A empresa foi criada por um grupo de 3 amigos que possuía em comum a paixão pela cerveja, que produziam desde meados de 2007. Encontra-se sediada em Ossela, Oliveira de Azeméis, e foi pioneira no mercado de cerveja artesanal em Portugal.

Devido ao constante crescimento desde a sua fundação, no final de 2015, a empresa mudou de instalações passando para uma área de aproximadamente de 1000 m<sup>2</sup>, sendo que 250 m<sup>2</sup> correspondem à área de produção cervejeira. Esta mudança levou ao aumento da capacidade de produção, sendo que atualmente é possível produzir cerca de 10<sup>6</sup> L de mosto anualmente e fermentar cerca de 30×10<sup>3</sup> L de cerveja mensalmente.

A Cerveja Vadia possui no seu catálogo quatro gamas diferentes de produtos: a gama harmonização, constituída por cervejas do estilo *Fruited Lager*, *Doppelbock*, *American Pale Ale*, *India Pale Ale* e *Baltic Porter*; a gama original, constituída por cervejas do estilo *German Pilsner*, *Wheat Beer*, *Dark Lager* e *Márzen*; a gama especial, constituída por cervejas do estilo *Portuguese Grape Lager* e *Sour*; e a gama sidra, constituída por sidras de maçã e de pera. Todos estes estilos permitiram à marca obter o reconhecimento nacional e internacional, conquistando medalhas em concursos internacionais, nomeadamente o *World Beer Awards* e o *World Cider Awards*.

A marca encontra-se comercializada por todo o país e tem como principal objetivo uma aposta consolidada no futuro, com a entrada dos seus produtos nos exigentes circuitos de distribuição internacionais, a melhoria constante dos seus produtos e possuir um produto adaptado ao consumidor português. [2]

## 2. Revisão bibliográfica

O sector de plantação mundial de lúpulo tem vivido um período de crescimento sustentável devido essencialmente ao grande aumento da produção de cerveja artesanal. O lúpulo é essencial para a indústria cervejeira uma vez que este fornece qualidades organoléticas a este produto, nomeadamente sabor e aroma. A mudança da preferência do consumidor, que começa a optar por cervejas aromáticas e de sabor intenso, provocou um aumento na produção de lúpulo, bem como na variedade de lúpulo aromático produzido. É esperado que a procura por cerveja artesanal e a sua produção continuem a aumentar nos próximos anos o que irá resultar num crescimento do uso e da procura de lúpulo. [3], [4]

### 2.1. Lúpulo

O lúpulo é uma planta trepadeira nativa da Europa, Ásia Ocidental e América do Norte. É uma planta dióica, significando que os órgãos reprodutores masculinos e femininos encontram-se em indivíduos diferentes, sendo o indivíduo feminino aquele que desenvolve os cones de lúpulo necessários para o processo cervejeiro. Os indivíduos masculinos são apenas cultivados quando é necessário hibridizar de modo a desenvolver novas variedades. São também plantas perenes sendo que apresentam uma produtividade entre 10 a 20 anos ou mais. Podem atingir uma altura média de 5 m e as suas raízes uma profundidade de 3,75 m, podendo ser suportadas por postes de madeira, de cimento ou por cordas. Dependendo da qualidade e da área de cultivo, o lúpulo deve ser cultivado com uma distância de 2,4 a 3,2 m entre filas e 1,1 a 1,7 m entre plantas da mesma fila. [1], [3]

Na produção comercial de lúpulo, são apenas cultivados os indivíduos femininos por fertilizar, que posteriormente desenvolvem os cones a partir das flores. No hemisfério norte, desde o início até meados de julho as plantas florescem e a partir das flores não fertilizadas desenvolvem-se os cones de lúpulo (flores femininas maduras) que consistem em camadas de pétalas de tecido mole onde as



glândulas de lupulina se formam e se parecem com grandes grãos de pólen amarelos oleosos e aromáticos (Figura 1 [5]).

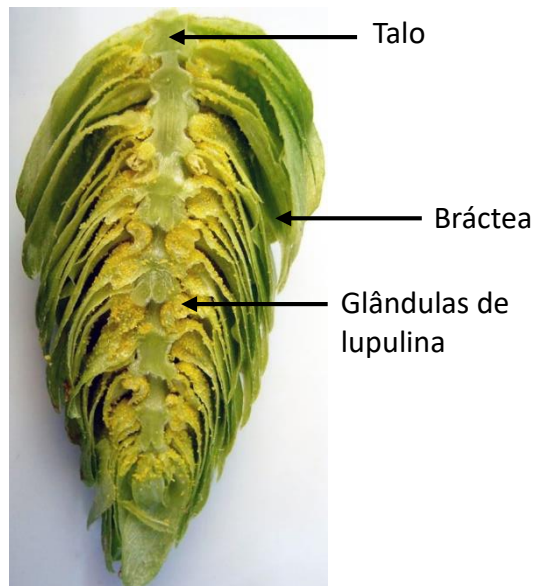


Figura 1 – Estrutura da flor de lúpulo<sup>[5]</sup>

Dependendo da variedade e das condições atmosféricas, a colheita pode ocorrer entre o fim de agosto e meados de setembro. De forma a armazenar os cones de lúpulo colhidos, estes necessitam de ser secos, porém este processo tem que ser executado cuidadosamente de forma a evitar a perda de resinas amargas e de compostos de aroma. O cultivo do lúpulo é extremamente dispendioso e exigente em termos de mão-de-obra. [1]

## 2.2. Características da plantação de Lúpulo

A produção de lúpulo é uma atividade bastante exigente em termos de investimento de capital. Estima-se que nas maiores produções europeias, o investimento inicial necessário para a plantação de lúpulo seja maior do que 15000€/ha, sendo que a este investimento pode crescer cerca de 25000€/ha em função da maquinaria especializada adquirida. Assim é de extrema importância a seleção adequada da localização da produção de modo a conseguir a recuperação do investimento. Os maiores fatores que determinam esta escolha passam por:

- Latitude;
- Temperatura (vernalização – certa quantidade de frio);

- Relevo do terreno;
- Qualidade do solo;
- Disponibilidade de água;
- Ausência de vento.

A latitude é um fator importante para a produção de lúpulo pois determina a exposição solar sazonal que condiciona os padrões de crescimento e o período de floração. A temperatura é igualmente um fator importante pois com a diminuição das horas diurnas desde o fim do verão até ao outono, a planta transita para uma fase de “descanso” designada por dormência, que quando se verifica insuficiente pode provocar um crescimento fraco e irregular durante a primavera.

Grande parte das produções de lúpulo ocorrem num terreno plano ou mediamente ondulado simplificando assim o estabelecimento e manutenção das plantas. Estas podem crescer em solos que podem ir desde ligeiramente arenosos até argilosos, contudo, é considerado ótimo um solo bem irrigado, profundo, “leve”, com boa fertilidade e pH correto, que é entre 6,2 e 6,6. Sem estas características o solo não fornece os nutrientes necessários à planta.

Durante os períodos de crescimento é necessário manter a humidade do solo que nunca deve ser saturado, e evitar a exposição a ventos fortes e quentes para não provocarem danos nas folhas e perdas de cones, de forma a obter-se um bom rendimento de produção de cones de lúpulo e garantir a sua qualidade.[4]

## 2.3. Produção mundial de Lúpulo

Com o crescimento progressivo da população mundial o consumo de cerveja também aumentou, tendo mesmo ultrapassado um consumo de 26,4 L anuais *per capita*, segundo dados de 2006. No entanto, uma mudança nas preferências dos consumidores faz com que estes optem cada vez mais por consumir cervejas aromáticas, nas quais a utilização de lúpulo assume um papel importante. [1]

O mercado global de cervejas artesanais foi avaliado em cerca de 38 mil milhões de dólares, e espera-se que este tenha um crescimento anual na ordem dos 14% no período de 2018 a 2023. Estes números devem-se essencialmente a novas preferências dos consumidores, que por um lado, preferem novos estilos e novos sabores, e por outro lado, procuram cerveja com uma baixa percentagem de

álcool, sendo que estão dispostos a pagar mais por estas características. A Europa é a região que lidera este mercado, logo seguida pela América do Norte, no entanto nestas zonas o mercado aproxima-se da fase de estagnação, existindo a necessidade por parte dos produtores explorar mercados em regiões como o Médio Oriente e Ásia-Pacífico. [6]

O aumento do consumo de cerveja artesanal influencia da mesma forma a utilização e produção de lúpulo, assim, a Europa assume-se, de igual modo, como o principal produtor de lúpulo. Este é produzido em 14 estados membros da União Europeia (UE) sendo que os principais países são a Alemanha e a República Checa, que juntos produzem mais de 80% do volume total produzido na Europa. Em 2008, a produção total da UE rondou as  $57 \times 10^3$  ton, mais de metade que a produção mundial. [3]

No período de 2000 a 2008 verificou-se que o número de produtores de lúpulo na UE diminuiu significativamente, devido essencialmente à falta de rentabilidade económica das plantações e ao abandono da agricultura por parte das gerações mais novas. No entanto, a área média de plantação por produtor aumentou, encontrando-se as maiores plantações na República Checa e as menores em Espanha e na Polónia. Apesar disto, o tamanho das plantações europeias é muito menor quando comparadas com as existentes na América do Norte, sendo que isto poderá afetar a competitividade da produção europeia a médio prazo. [3]

Na Figura 2 está representada a produção mundial de lúpulo no período de 2008 a 2017 verificando-se que a produção aumentou ao longo do mesmo, acompanhando o crescimento do consumo de cerveja. No entanto verifica-se uma diminuição na produção entre os anos de 2010 e 2012 provocada pela crise económica mundial. Para além disto, existiu o aparecimento de novos países produtores de lúpulo fora das zonas de habitual produção, como a Etiópia e a Austrália. Em 2017, a lista de maiores produtores de lúpulo é encabeçada pelos EUA (47340 ton), logo seguida pela Etiópia (38418 ton) e pela Alemanha (32582 ton), segundo dados da *Food and Agriculture Organization*. [7]

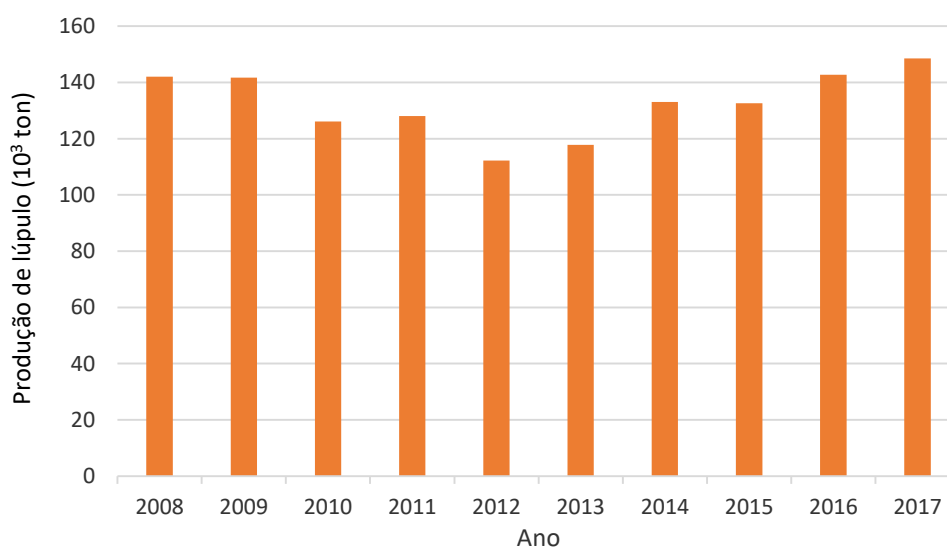


Figura 2 – Produção mundial de lúpulo [7]

Nas décadas de 60 a 80, o mercado de lúpulo em Portugal atingiu o seu máximo, sendo que a meados deste período, a produção deste satisfazia totalmente as necessidades do setor cervejeiro nacional. Instaladas nos distritos de Braga e Bragança, as plantações de lúpulo apresentavam alguma expressão económica nestas regiões, tendo-se atingido um máximo de área plantada em 1976, correspondente a 205,8 ha.[8], [9]

Em 2002, existiam em Portugal cerca de 14 plantações de lúpulo, sendo que cada uma delas tinha em média uma área de 2,6 ha. Quando comparados estes valores com os referentes ao ano de 2008, verifica-se que o número de plantações reduziu-se para 5, no entanto, a área média de cada uma delas aumentou para 5 ha. [3]

Hoje em dia, o mercado nacional do lúpulo é residual, existindo apenas dois produtores na região de Bragança, num total de 12 ha, repartidos de igual forma pelos dois. A totalidade da produção é destinada à indústria cervejeira portuguesa. [8], [9]

As razões que levaram ao declínio deste setor em Portugal são várias, nomeadamente, a abundância de lúpulo nos mercados mundiais, flutuação de preços, baixa rentabilidade económica das plantações, grande necessidade de investimento em mão-de-obra e/ou em maquinaria especializada e abandono da agricultura por parte das gerações mais novas. [8], [9]

O crescimento do consumo de cerveja artesanal não se apresenta como uma solução viável para o sector nacional da produção de lúpulo, uma vez que este tipo de cervejas utiliza diversas variedades de lúpulo de aroma, enquanto que em Portugal apenas se produz um tipo de lúpulo de amargor (variedade *Nugget*).[8], [9]

## 2.4. Principais utilizações do Lúpulo

Devido às suas propriedades de conservante natural, o lúpulo foi usado primeiramente na cerveja com a função de a conservar. Mas para além disto, o lúpulo confere à cerveja amargor, devido à presença de resinas amargas designadas por  $\alpha$ -ácidos, sabores e aromas característicos.

As variedades de lúpulo podem ser divididas em dois grupos, conforme a sua finalidade de utilização:

- Lúpulos de amargor (lúpulos de fervura) – são ricos em  $\alpha$ -ácidos, compostos que quando isomerizados conferem amargor à cerveja, e são acrescentados no início da ebulição;
- Lúpulos de aroma (lúpulos de acabamento) – são utilizados para conferir sabor e aroma à cerveja e são adicionados no final ou após a ebulição.

Existem também variedades capazes de ser utilizadas para os dois fins, para o amargor e aroma. Na Tabela 1 estão presentes algumas das variedades de lúpulo utilizadas e respetivas características. [10], [11]

Tabela 1 – Exemplos de variedades de lúpulos de amargor e de aroma<sup>[12]</sup>

<b>Lúpulos de amargor</b>				
<b>Variedade</b>	<b>Origem</b>	<b>Perfil</b>	<b>% <math>\alpha</math>-ácidos</b>	<b>% total de óleo</b>
<i>Chinook</i>	EUA	Aroma apimentado e a pinho, amargor forte e versátil	12-14	1,7-2,7
<i>Brewer's Gold</i>	EUA, Reino Unido	Traços de aroma apimentado, amargor intenso	7,1-11,3	2,2-2,4

<i>Magnum</i>	EU, EUA	Sabores cítricos e amargor limpo	11-16	1,6-2,6
<i>Nugget</i>	EUA	Aroma a erva, amargor sólido	9,5-14	0,9-2,2
<b>Lúpulos de aroma</b>				
<i>Ella</i>	Austrália	Aroma tropical, cítrico e floral	13,3-16,3	2,9
<i>Helga</i>	Austrália	Aroma floral e apimentado	5,4-7,5	0,6-0,7
<i>Simcoe</i>	EUA	Sabores cítricos e aromas a uva, pinho e erva	12-14	2-2,5
<i>Topaz</i>	Austrália	Aroma a fruta tropical, apimentado e ligeiramente resinoso	13,7-17,7	0,8-1,7

Durante a realização deste trabalho foram utilizadas três variedades diferente de lúpulo de aroma, a variedade *Ella*, a variedade *Topaz* e a variedade *Simcoe*. A primeira variedade contém uma grande quantidade de óleos essenciais capaz de conferir diferentes características dependendo da quantidade utilizada, onde pequenas quantidades proporcionam à cerveja um carácter picante e floral, enquanto que grandes quantidades são capazes de conferir aromas a fruta tropical e uva. Da mesma forma, a segunda variedade proporciona um aroma a fruta tropical, mas para além disto, confere um aroma resinoso e a erva. A última variedade contém grandes qualidades aromáticas e é capaz de conferir um carácter aromático a fruta, erva e a pinho. [13]–[15]

Através das suas características e adicionando diferentes variedades de lúpulo em diferentes fases do processo da produção de cerveja é possível obter-se um equilíbrio entre o amargo e o aroma. Assim, é possível determinar fases do processo onde é essencial a adição de uma certa variedade de lúpulo.

A lupulagem do primeiro mosto (*first wort hopping* – FWH) consiste em acrescentar uma grande porção de lúpulo de aroma ao mosto quente, de forma a que este liberte as suas resinas e óleos essenciais, que tendem a ser arrastados pelo vapor de água durante a ebulição. Assim, os compostos terpénicos presentes nos óleos essenciais que se transferem para o mosto possuem mais tempo para oxidar a compostos mais solúveis, sendo que a retenção dos compostos oxidados durante a fase de fervura é maior. [10]

Nesta fase apenas podem ser usados lúpulos de aroma com baixa concentração de  $\alpha$ -ácidos, de forma a que o amargor da cerveja não aumente de forma significativa. Quando se realiza o FWH obtêm-se aromas mais refinados e amargores mais uniformes, dando origem a cervejas mais harmoniosas. [10]

A indústria cervejeira discrimina o amargor do sabor sendo o amargor uma característica conferida pelo lúpulo enquanto que o sabor é o resultado da combinação das características das matérias primas e do processo de fermentação da cerveja. Os lúpulos que conferem amargor são adicionados ao mosto e fervidos de forma a que os  $\alpha$ -ácidos possam ser isomerizados. Para além dos  $\alpha$ -ácidos, o lúpulo contém óleos essenciais que tendem a ser arrastados pelo vapor de água durante a ebulição. Assim, o lúpulo não irá conferir, de forma perceptível, sabor e aroma ao mosto. Em conclusão, nesta fase, são utilizadas variedades de lúpulo com uma grande concentração de  $\alpha$ -ácidos, de forma a que se forneça a quantidade de amargor necessária sem nunca comprometer o sabor e o aroma da cerveja. [10] Para colmatar este problema adiciona-se lúpulo de aroma ao mosto, normalmente 30 minutos antes do final da ebulição, de forma a obter um equilíbrio entre a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos e o arrastamento dos óleos essenciais, levando à formação dos sabores pretendidos pela indústria cervejeira. Para este propósito, pode ser utilizada qualquer variedade de lúpulo, no entanto, as variedades que possuem uma percentagem menor de  $\alpha$ -ácidos são as preferenciais. [10]

A adição de lúpulo nos últimos momentos de fervura do mosto traduz-se numa redução do arrastamento dos componentes voláteis pelo vapor, que conferem aroma e sabor à cerveja. Podem ser usadas várias variedades de lúpulo, sendo que esta adição ocorre geralmente 15 minutos antes do fim da fervura ou 10 minutos antes do mosto ser arrefecido. Este processo pode ocorrer usando um

*hopback*, em que o mosto flui por uma câmara cheia de lúpulos frescos. No entanto, a adição tardia pode levar a que a cerveja adquira um sabor indesejado a “relva cortada” e adstringência, devido à presença de taninos e outros componentes, geralmente neutralizados pela fervura. A ebulição provoca uma coagulação dos taninos formando um complexo insolúvel no mosto. [10]

No *dry-hopping*, o lúpulo é adicionado ao fermentador, quando a atividade das leveduras neste for reduzida ou nula, e a cerveja esteja a passar para a fase de maturação depois de filtrada, de forma a aumentar o seu sabor e aroma, através da dissolução dos compostos voláteis. Caso a adição do lúpulo seja efetuada quando ainda esteja a decorrer fermentação, grande parte dos compostos voláteis serão “arrastados” pelo dióxido de carbono resultante da fermentação. [10] Este método será explicado pormenorizadamente mais à frente neste trabalho.

## 2.5. Produtos derivados de Lúpulo

Os produtos de lúpulo existentes têm como principal função a redução de volume quando comparados com o produto em flor. Diferentes produtos são utilizados para diferentes fins durante o processo de produção. Enquanto que os produtos convencionais e os especiais podem ser utilizados para conferir amargor, aroma e sabor, os produtos isomerizados são usados essencialmente para atribuir o amargor característico da cerveja. Na Tabela 2 está presente uma comparação entre os produtos convencionais, e mais utilizados, do lúpulo. [10], [11]

Tabela 2 – Comparação entre os produtos de lúpulo mais utilizados <sup>[10]</sup>, <sup>[11]</sup>

Produtos	Vantagens	Desvantagens
Flor	Fáceis de retirar do mosto; Melhores características de aroma quando frescos; Boa forma para <i>dry-hopping</i> .	Absorvem o mosto, existindo uma perda deste após a fervura; Difíceis de pesar; Mais facilmente oxidáveis.
<i>Plugs</i> ( <i>pellets</i> tipo100)	Permanecem frescos por mais tempo; Comportam-se como lúpulos inteiros na fervura; Boa forma para <i>dry-hopping</i> .	Absorvem o mosto, da mesma forma que a flor.
<i>Pellets</i>	Fáceis de pesar; Pequeno aumento na isomerização devido à moagem;	Formam uma camada superficial na panela de fervura; Difícil para usar em <i>dry-hopping</i> ;



	Não absorvem mosto; Fácil armazenamento.	Menor conteúdo aromático devido ao processamento.
Extrato	Fácil armazenamento; Mais estável e uniforme; Melhor utilização; Reduz a perda de mosto.	Elevados custos.

A forma de lúpulo mais utilizada pelas cervejeiras a nível mundial são os *pellets* uma vez que estes podem ser armazenados por um longo período de tempo sem necessitarem de grandes cuidados. No entanto, durante o processamento deste produto as glândulas de lupulina são esmagadas fazendo com que os compostos de amargor e de aroma oxidem de forma mais rápida. Desta forma, é necessário empacotar este produto em embalagens sob vácuo ou sob atmosferas de nitrogénio e/ou dióxido de carbono. [11], [16]

Os *pellets* podem ser ainda divididos conforme a sua composição, em *pellets* do tipo 90, que contêm cerca de 90% de todos os componentes não resinosos presentes nos cones, e *pellets* do tipo 45, que são enriquecidos em lupulina e são produzidos mais frequentemente para lúpulos aromáticos, caracterizados por possuírem uma baixa percentagem de  $\alpha$ -ácidos. [11], [16]

Os extratos são obtidos a partir de uma extração com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que pode ser supercrítico ou líquido, sendo que é a partir da extração com  $\text{CO}_2$  líquido que se produzem extratos mais puros. Por outro lado, os extratos obtidos a partir de  $\text{CO}_2$  supercrítico contêm uma percentagem maior de  $\alpha$ -ácidos. [11], [16]

## 2.6. Composição do Lúpulo

As glândulas de lupulina (glândulas amarelas em forma de copo) presentes nos cones do lúpulo são de extrema importância para a indústria cervejeira pois nelas encontram-se as resinas amargas ( $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos), polifenóis e óleos essenciais que transmitem características organoléticas e propriedades conservantes à cerveja. Contudo a composição do lúpulo depende de várias circunstâncias, tais como, a variedade, a idade, a proveniência, as condições de



A utilização destas substâncias tem como principal função conferir à cerveja uma agradável amargura, mas para além disto, também ajudam a manter a insalubridade, estabilizam a espuma, devido a propriedades tensioativas e aumentam o tempo de vida da cerveja através das suas propriedades antibacterianas. [11], [17]–[19]

A amargura conferida à cerveja e conseqüentemente o valor da produção da mesma dependem das diferentes substâncias, sendo que a solubilidade destas, quer no mosto quer na cerveja, é extremamente importante de forma a conferir amargor com a qualidade desejada pela indústria cervejeira. Os  $\alpha$ -ácidos encontram-se nas glândulas de lupulina dos cones, são caracterizados por possuir 2 grupos isopreno, e são maioritariamente compostos por humulona, co-humulona e ad-humulona, que são insolúveis até a sua isomerização pela ebulição do mosto (Figura 4), e esta é tanto maior quanto maior for o tempo de ebulição. A reação de isomerização consiste na alteração da forma estrutural de um composto mantendo a sua fórmula molecular, neste caso através da elevada temperatura. Assim, as substâncias que apresentam características para um maior potencial de amargura são os iso- $\alpha$ -ácidos e os seus derivados, sendo os mais comuns o *cis*- e *trans*-iso-humulona. Por outro lado os  $\beta$ -ácidos, caracterizados por terem 3 grupos isopreno, não contribuem para este fim devido à baixa solubilidade no mosto, visto este ter um baixo valor de pH, encontrando-se apenas quantidades vestigiais na cerveja. No entanto, uma vez que estes últimos são bastante hidrofóbicos, a sua capacidade antibacteriana é superior à dos  $\alpha$ -ácidos. Os  $\beta$ -ácidos são formados essencialmente por compostos como a lupulona, co-lupulona e ad-lupulona. [11], [17], [18]

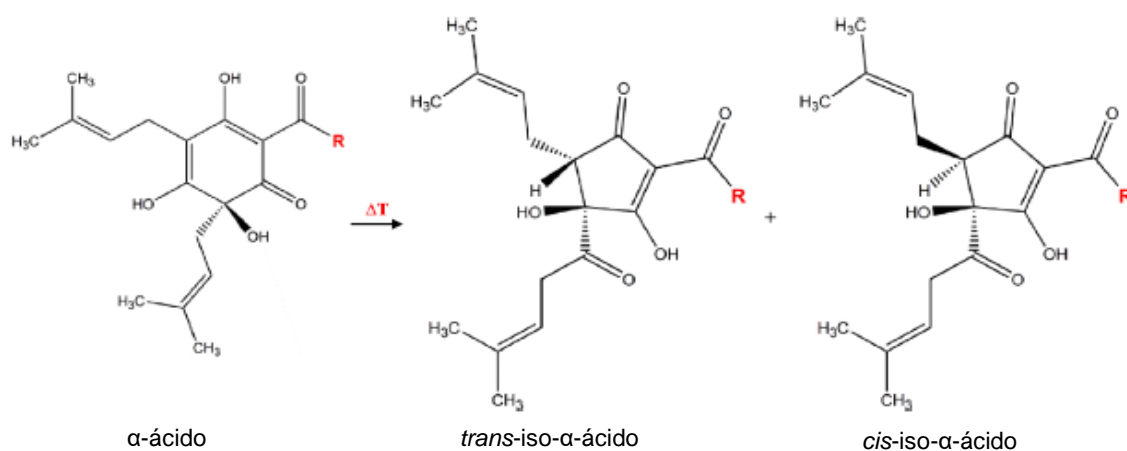


Figura 4 – Esquema da reação de isomerização de  $\alpha$ -ácidos<sup>[18]</sup>

## Compostos de aroma

Os óleos essenciais presentes nas glândulas de lupulina são os principais contribuidores para as características de aroma. Estes constituem cerca de 4% do cone de lúpulo, e são constituídos por terpenos (50 a 80%), por compostos oxigenados (20 a 30%) e por compostos de enxofre (menos de 1%). Na Figura 5 está presente a classificação em famílias e os compostos maioritários de cada família presentes nos óleos essenciais de lúpulo. [11], [20]

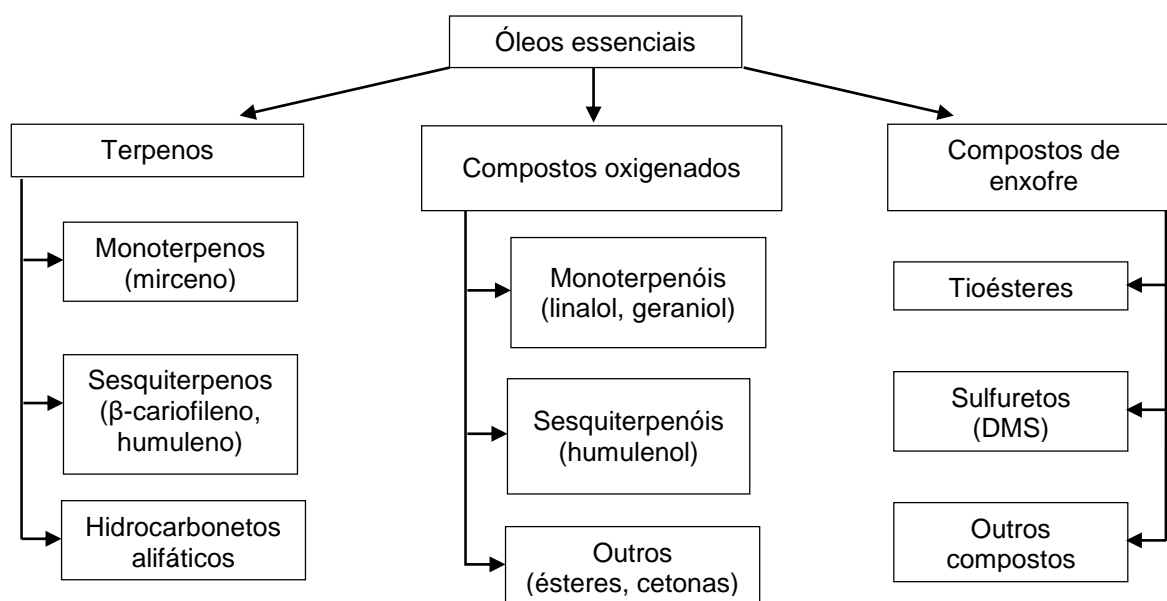


Figura 5 – Classificação dos principais compostos presentes nos óleos essenciais de lúpulo [20]

Quando adicionados na fase de ebulição, os terpenos tendem a ser arrastados pelo vapor de água, fazendo com que estes compostos apenas sejam perceptíveis no produto final quando introduzidos numa fase posterior à fervura. Os terpenos presentes em maior quantidade nos óleos essenciais são o mirceno, o  $\beta$ -cariofileno e humuleno. O primeiro é um monoterpeno (composto isoprénico constituído uma cadeia principal de 10 carbonos) que corresponde a cerca de 50% do total de óleos essenciais, com um aroma resinoso e herbáceo, nem sempre desejável, enquanto que os outros dois compostos são sesquiterpenos (composto isoprénico com uma cadeia principal constituída por 15 carbonos). [11], [20] Na Figura 6 estão presentes as estruturas químicas dos compostos referidos. [21]–[23]

Os compostos oxigenados encontram-se em maiores quantidades no produto final devido a serem mais solúveis e com aroma em comparação aos

compostos não oxigenados, e também devido às transformações que ocorrem durante o processo de fermentação devido à ação metabólica das leveduras. [11], [20]

Devido à sua baixa concentração nos óleos essenciais, os compostos de enxofre dificilmente se encontram presentes no produto final. Apesar disto, estes compostos, maioritariamente sulfureto de dimetilo, dissulfureto de dimetilo e trissulfureto de dimetilo, podem ou não influenciar o aroma da cerveja, caso exista ou não interação das moléculas de enxofre com as leveduras durante o processo fermentativo, podendo levar à formação de aromas não agradáveis, devendo ser evitados. [11], [20]

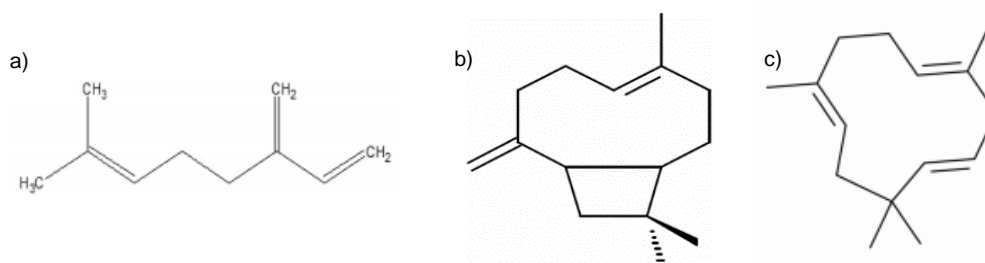


Figura 6 – Estrutura química do a) mirceno<sup>[21]</sup>, b)  $\beta$ -cariofileno<sup>[22]</sup> e c) humuleno<sup>[23]</sup>

## 2.7. Composição volátil da cerveja

Nos mais variados estilos de cerveja é possível encontrar numerosos compostos voláteis (Tabela 4) de aroma que provêm de diferentes origens durante o processo cervejeiro, como o malte, lúpulo e o processo de fermentação. Relativamente ao lúpulo, características como a variedade, armazenamento, momento de lupulagem, entre outros, podem alterar a quantidade e o tipo de compostos fornecidos à cerveja. Da mesma maneira, os processos que ocorrem durante a fermentação alteram os compostos presentes no produto final. [24], [25]

Os óleos essenciais presentes no lúpulo são constituídos essencialmente por terpenos como o mirceno, o humuleno e o  $\beta$ -cariofileno, no entanto, os compostos oxigenados como os terpenóis (linalol,  $\beta$ -citronelol, nerol), presentes nos óleos essenciais, são mais facilmente retidos no mosto e na cerveja que os terpenos por serem hidrofílicos. [25]

A percentagem de compostos monoterpénicos é aquela que se encontra em maior quantidade em vários estilos de cerveja, de seguida, encontram-se os compostos sesquiterpénicos. Alguns destes componentes não provêm diretamente dos óleos essenciais presentes no lúpulo, derivando do metabolismo de produtos degradados ou isomerizados como o caso de  $\alpha$ -ácidos,  $\beta$ -ácidos, polifenóis e compostos terpénicos. Compostos como o linalol, citronelol e terpeniol são metabolitos derivados de compostos do lúpulo, sendo que a reação que mais frequentemente ocorre durante a produção cervejeira é a isomerização do geraniol a linalol através da ação metabólica das leveduras presentes durante a fermentação do mosto (Figura 7). Posteriormente, o linalol pode ser isomerizado a  $\alpha$ -terpineol, sendo que este último composto tem um maior impacto benéfico no aroma do produto final devido ao menor limite de perceção sensorial. [24]–[26]

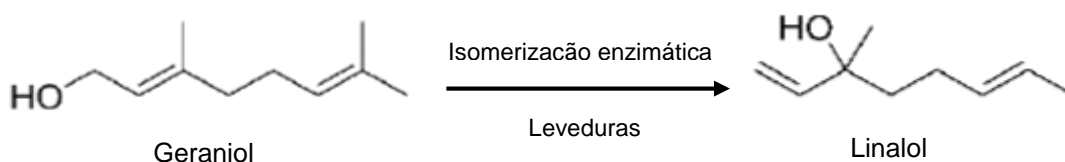

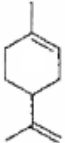

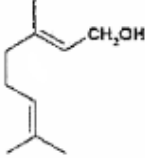

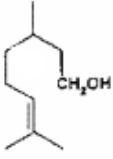
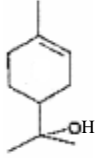


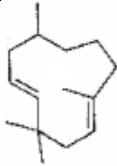
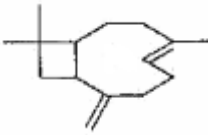
Figura 7 – Reação de isomerização enzimática do geraniol a linalol<sup>[26]</sup>

Devido às suas propriedades físicas e químicas, os monoterpénos e os sesquiterpénos não são normalmente encontrados na cerveja em concentrações acima do seu limite de perceção sensorial. Por outro lado, grande parte dos compostos oxigenados, como os monoterpénóis, estão presentes na cerveja acima dos seus limites de perceção sensorial, sendo aqueles que mais contribuem para a existência do “*hoppy*” aroma, caracterizado pela presença de compostos como o linalol, geraniol, nerol e  $\alpha$ -terpineol e que se traduz num aroma frutado e floral. [26]

É possível encontrar diferenças na composição volátil de cervejas consoante a sua escala de produção. Para cervejas produzidas em pequena escala, em microcervejeiras, a composição global de compostos terpénicos é maior quando comparadas com as produzidas a nível industrial. Isto deve-se essencialmente às características das matérias-primas utilizadas, nomeadamente o lúpulo, e de algumas fases do processo cervejeiro, como a fermentação, clarificação, enchimento e pasteurização, que são realizadas de forma diferente ou não são realizadas em microcervejeiras. [25]

Tabela 4 – Estrutura, descritores de aroma e limites de percepção sensorial de alguns compostos voláteis de aroma presentes na cerveja

Composto	Estrutura <sup>[27]</sup>	Descritor de aroma <sup>[27]</sup>	Limites de percepção sensorial
Monoterpenos			
Mirceno		Resinoso, herbáceo	30-1000 mg/L <sup>[20]</sup>
Limoneno		Cítrico, laranja	
α-pineno		Pinho, herbáceo	
Monoterpenóis			
Geraniol		Floral, doce, rosas	4-40 mg/L <sup>[20]</sup>
Linalol		Floral, laranja	8-80 mg/L <sup>[20]</sup>
Citronelol		Frutado, cítrico	9 µg/L <sup>[26]</sup>
α-terpineol		Floral, lilás	450 µg/L <sup>[26]</sup>
Sesquiterpenos			

$\alpha$ -humuleno		Madeira, pinho	450 $\mu\text{g/L}$ <sup>[26]</sup>
$\beta$ -carofileno		Madeira, herbáceo	230 $\mu\text{g/L}$ <sup>[26]</sup>

## 2.8. *Dry-hopping*

### 2.8.1 Relevância do *dry-hopping* para o processo cervejeiro

O crescimento da procura por cerveja artesanal provocou o ressurgimento do método de *dry-hopping* de forma a conferir aroma e sabor. Atualmente, este termo refere-se à adição de lúpulo, ou dos seus produtos, nos vasos de fermentação, de maturação ou em barris, de forma a ocorrer a dissolução de compostos aromáticos. A realização deste processo contribui também para a estabilidade coloidal, uma vez que são formados complexos insolúveis, e da espuma, devido a alguns compostos presentes no lúpulo terem propriedades tensioativas.[19], [20], [28], [29]

Na maior parte dos casos, este método ocorre após a fermentação de forma a que os compostos voláteis não sejam sujeitos às altas temperaturas características das fases iniciais da produção cervejeira, que poderiam provocar o seu arrastamento ou oxidação. Para além disto, uma fermentação muito extensa e a conseqüente formação de dióxido de carbono em grandes quantidades poderá causar o arrastamento dos compostos voláteis responsáveis pelas características de aroma e sabor provocando assim uma diminuição no rendimento deste método. A presença de leveduras durante o *dry-hopping* pode elevar a complexidade deste processo, uma vez que pode existir a biotransformação de certos componentes voláteis presentes no lúpulo, a presença do terpeno citronelol depende da metabolização do geraniol por parte das leveduras. No entanto, estas podem trazer benefícios ao processo, uma vez que são capazes de metabolizar oxigénio que se dissolve durante a execução do mesmo, e assim evitar a oxidação da cerveja. [20], [28], [29]

Existem várias variáveis que ocorrem durante o processo de *dry-hopping* que podem influenciar a forma como este ocorre e a qualidade do produto final. Uma das



maiores questões que envolvem este método é o tipo de produtos de lúpulo a utilizar. Os cones e os *pellets* são os produtos preferenciais utilizados pelos cervejeiros, mas embora os *pellets* possuam uma percentagem menor de óleos e de compostos de aroma devido ao seu processamento, estes dissolvem-se mais rapidamente do que aqueles presentes nos cones, uma vez que a área de contacto superficial é maior. Assim, é possível obter resultados satisfatórios usando *pellets*. [11]

A temperatura é também um ponto crítico durante o *dry-hopping*. Com o aumento da temperatura a que ocorre o processo aumenta-se a velocidade de extração dos óleos essenciais e dos compostos de aroma, reduzindo o tempo de *dry-hopping*. No entanto, uma maior temperatura aumenta também o risco de extração de componentes indesejáveis capazes de conferir ao produto final sabores e aromas que não são apreciados pelo consumidor. Desta forma, é necessário que exista um controlo da temperatura para que haja um equilíbrio entre o tempo em que ocorre o processo e os compostos extraídos. Na indústria cervejeira as temperaturas utilizadas para a realização deste processo dependem bastante do estilo de cerveja e do método utilizado, podendo ir desde os 5°C até aos 25°C. [11]

O tempo de contacto, ou a duração do processo, é também um fator importante para controlar a extração de compostos do lúpulo para a cerveja. Longos períodos de *dry-hopping* podem provocar a “migração” dos compostos de aroma da cerveja de volta para o lúpulo, devido à hidrofobicidade destes. Pode também levar à extração de compostos indesejáveis, capazes de conferir ao produto final aromas e sabores semelhantes a vegetais e a erva, característicos de aldeídos como por exemplo o hexanal [29]

O elevado teor alcoólico da cerveja atua de forma semelhante à elevada temperatura e ao excessivo tempo de residência do processo. Devido à grande capacidade de solvatação do etanol, este é capaz de extrair componentes indesejáveis para o produto final, atribuindo-lhe características aromáticas próximas de vegetais e erva. [29]

Existem variáveis como a quantidade de lúpulo utilizado e a geometria do equipamento, que também influenciam a forma como o processo decorre. A variedade de lúpulo é também uma característica essencial para a realização do *dry-hopping* e para obtenção das características organoléticas pretendidas. Neste processo são utilizadas essencialmente as variedades de aroma, capazes de conferir os aromas e sabores ao produto final perceptíveis pelo consumidor. [11]

A utilização deste processo não apresenta quaisquer consequências malignas para a cerveja final pois a contaminação desta por parte do lúpulo é extremamente rara. Apesar disto existem desvantagens que podem ocorrer, como a presença de partículas sólidas que pode levar a uma diminuição do tempo de vida dos filtros usados na etapa de filtração, a perda de cerveja por absorção das partículas sólidas e a possibilidade de introdução de oxigénio no processo que mais tarde poderá levar à oxidação do produto final. [30]

## 2.8.2. Métodos de *dry-hopping*

O *dry-hopping* pode ser realizado colocando os produtos de lúpulo diretamente em contacto com a cerveja, porém não existe um consenso sobre o método mais eficaz de o realizar. Ao longo dos tempos, os cervejeiros desenvolveram métodos e equipamentos diferentes baseados na linha de produção, na capacidade de produção e nas suas capacidades.

No método de lama é necessário que ocorra a dissolução dos produtos de lúpulo. Para que isto aconteça, os produtos de lúpulo são adicionados a um tanque agitado, contendo água ou cerveja, de forma a criar uma “lama” que posteriormente é transferida para a cerveja que se encontra na fase de fermentação/maturação. É um método simples, que exige menos trabalho laboral e menos tempo e tem como principal vantagem ocorrer num sistema fechado, reduzindo o risco de contaminação microbiana e de oxidação. [11], [30]

O *Hop Cannon* é um equipamento projetado como um dispositivo de bombeamento que utiliza CO<sub>2</sub> pressurizado como força de transporte para que ocorra o movimento de *pellets* através de um tubo conectado entre o equipamento e o topo das cubas de maturação. As principais vantagens deste sistema são o elevado grau de segurança, de higiene, fácil manuseamento, ocupa pouco espaço e melhora a estabilidade da cerveja. Para além disto, reduz a possibilidade de existência de oxigénio dissolvido evitando assim uma possível oxidação do produto final. No entanto, possui algumas desvantagens, tais como, a utilização única de *pellets*, necessidade de grandes custos de aquisição, a utilização de uma grande quantidade de CO<sub>2</sub> e é necessário o manuseamento por um operário habilitado. [11], [31]

O Torpedo é um dos métodos mais simples e mais utilizados por parte da indústria cervejeira e consiste num tanque de recirculação. Os produtos de lúpulo são introduzidos neste equipamento, que é posteriormente pressurizado com CO<sub>2</sub>, sendo que a cerveja circula desde a cuba para o fundo deste. Daqui a cerveja segue para a parte superior do torpedo, passando pelos produtos de lúpulo ocorrendo a extração dos compostos, e de seguida segue novamente para o interior da cuba de maturação. Este processo é repetido até o produto obter as características de sabor e aroma pretendidas. Tem como desvantagem a variação drástica dos resultados quando existem mudanças a nível da temperatura e do caudal de circulação. [11] Este método é bastante semelhante à coluna de recirculação utilizada para executar o processo de *dry-hopping* realizado durante a execução deste trabalho.

Existem ainda outros métodos de realização de *dry-hopping*, entre os quais a simples adição de produtos de lúpulo à cerveja, sendo que estes podem estar dentro de um “saco” ou em contacto direto, de forma a que ocorra a dissolução dos compostos desejados. As principais desvantagens passam pelo facto de a extração dos compostos pretendidos não ocorrer de forma ótima e não ser uniforme, sendo que a concentração destes em zonas mais afastadas dos produtos de lúpulo pode ser muito baixa, existindo uma grande discrepância na intensidade de sabor e aroma da cerveja. [11], [30], [31]

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Realização de *dry-hopping*

O *dry-hopping* foi realizado em dois estilos diferentes de cerveja. A primeira é do estilo *India Pale Ale* (IPA), sendo tipicamente caracterizado por ser bastante amargo e extremamente aromático devido à maior quantidade de lúpulos usados durante a sua preparação. Neste método são utilizados dois tipos diferentes de lúpulo, ambos provenientes da Austrália, sendo eles a variedade *Ella* e a variedade *Topaz*. A segunda cerveja é do estilo *German Pilsner*, caracterizado por um amargor médio, e aroma e sabor intensos a malte. Para a realização do processo de *dry-hopping* foi utilizado lúpulo da variedade *Simcoe*.

O equipamento de *dry-hopping* utilizado é constituído por uma coluna de recirculação, contendo a quantidade necessária de lúpulo em *pellets* imobilizados num leito fixo, que juntamente com uma bomba, se encontram ligados à cuba na qual a cerveja se encontra a maturar. A representação da montagem deste equipamento encontra-se presente na Figura 8.



Figura 8 – Montagem do equipamento de *dry-hopping*

Este método é executado após a etapa de filtração e antes da carbonatação. A execução deste iniciou-se com a pesagem das diferentes variedades de lúpulo utilizado. De salientar que foi realizado o *dry-hopping* para uma produção de cerveja

*India Pale Ale* (IPA) de aproximadamente 2000L pela primeira vez na empresa, pelo que as quantidades utilizadas foram o dobro do habitual (produção de 1000L), tendo-se obtido uma razão de lúpulo utilizado por litro de cerveja de 2,7 g/L. O lúpulo pesado foi posteriormente colocado em recipientes porosos, e estes quando fechados foram colocados dentro da coluna de recirculação juntamente com um suporte com a função de impedir que a entrada e a saída da coluna ficassem entupidadas com o lúpulo.

Posteriormente, ligou-se a saída da cuba de maturação à coluna de recirculação, sendo que a entrada nesta é efetuada por baixo, enquanto que a saída se realiza por cima. Isto tem a finalidade de aumentar o tempo de contacto da cerveja dentro do equipamento de *dry-hopping* proporcionando assim uma maior transferência de componentes entre o lúpulo e a própria cerveja. Após a coluna se encontrar cheia, procedeu-se à ligação da saída da mesma a uma bomba, e desta novamente à cuba de maturação. Esta configuração permite a recirculação da cerveja entre os equipamentos e que esta passe de forma uniforme pelo processo de *dry-hopping*.

Foram retiradas amostras de cerveja antes do início do processo, ao longo do tempo em que este decorreu, a 2 horas, 4,5 horas e 6,75 horas após o início do mesmo, e depois da sua conclusão que ocorreu cerca de 10,75 horas após o início. Depois de retiradas, as amostras permaneceram armazenadas a baixa temperatura para posterior análise sensorial e análise à composição volátil.

De seguida à conclusão do *dry-hopping* a cerveja permaneceu em maturação na cuba cerca de 12 dias, antes do posterior engarrafamento, sendo que foram realizadas provas organoléticas ao longo deste período.

Para a produção da cerveja do estilo *German Pilsner*, o processo foi realizado de maneira semelhante ao descrito anteriormente. No entanto, foram produzidos cerca de 250L deste tipo de cerveja, e como tal a quantidade de lúpulo utilizado foi bastante inferior (razão de lúpulo utilizado por litro de cerveja de 3,2 g/L), bem como o tempo de duração do processo (cerca de 5 horas e meia). Para além disto, o *dry-hopping* foi também realizado com uma variedade de lúpulo diferente. Deste processo foram retiradas duas amostras de cerveja e duas de lúpulo, antes e depois da realização do mesmo, para cada um dos produtos, de

forma a determinar a presença de compostos voláteis capazes de conferir aroma e sabor em cada uma das amostras.

### 3.2. Análise da composição volátil do lúpulo e da cerveja

As análises das amostras acima referidas foram realizadas nos laboratórios da Universidade de Aveiro. Estas tiveram como objetivo fazer uma análise do perfil dos compostos voláteis que poderão conferir aroma e sabor à cerveja e estão presentes nos produtos de lúpulo. Para isto foi necessário recorrer ao processo de microextração em fase sólida em espaço de cabeça e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME/GC-MS).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração simples e eficaz, capaz de eliminar a necessidade de utilização de solventes para a pré-concentração de compostos voláteis e semi-voláteis em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. Esta técnica pode ser implementada de duas formas diferentes, num sistema de 2 fases, onde o analito é colocado diretamente em contacto com a fase estacionária (sólida, líquida ou mista), ou num sistema de 3 fases onde a fase estacionária é colocada no “espaço de cabeça”, sendo esta última forma a utilizada no trabalho (HS-SPME). [32], [33] O processo de microextração em fase sólida foi realizada segundo um protocolo descrito na literatura. [25]

O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrómetro de massas combina a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia com a obtenção de informação estrutural e de massa molecular da espectrometria de massa. A técnica de GC-MS é aplicada a compostos voláteis termicamente estáveis nas temperaturas elevadas que ocorrem durante o processo de separação cromatográfico. [34], [35]

Antes da realização do processo as amostras de cerveja foram previamente degaseificadas. A fibra de SPME utilizada, uma fibra tripla, sofreu um processo de dessorção térmica antes da sua utilização de forma que pudessem ser eliminados quaisquer contaminantes voláteis existentes. De seguida, recorreu-se ao GC-MS para se realizar um ensaio branco à fibra de forma a conferir a ausência de contaminantes. Previamente foi também realizado um ensaio branco sem a presença da fibra, com a finalidade de avaliar a ausência de contaminantes na

coluna de cromatografia. Na Tabela 5 estão presentes as fibras de SPME disponíveis comercialmente, para além daquela utilizada na realização do processo.

Tabela 5 – Fase estacionária da fibra de SPME utilizada [32], [33]

Fase estacionária	Espessura do filme ( $\mu\text{m}$ )	Tipo	Intervalo de temperatura do injetor GC ( $^{\circ}\text{C}$ )	Aplicação
DVB/CAR/PDMS	30 50	Bipolar	200-270	Hidrocarbonetos voláteis, compostos de aroma

PDMS: Polidimetilsiloxano; DVB: Divinilbenzeno; CAR: Carboxen

Colocaram-se 10 mL das amostras líquidas num frasco de 20 mL, enquanto que para o lúpulo foi necessário diluir cerca de 0,500 g em 10 mL de água destilada, sendo que a mistura foi posteriormente transferida para o frasco de 20 mL. Adicionaram-se cerca de 2 g de cloreto de sódio (NaCl) a cada um dos frascos. Estes foram transferidos para um banho termostaticado a uma temperatura de ( $40 \pm 0,1$ )  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos e com agitação de uma barra magnética a 400 rpm, e de seguida, colocou-se a fibra de SPME no espaço de cabeça do frasco durante 30 minutos, mantendo a temperatura e a agitação constantes. A montagem experimental encontra-se presente na Figura 9.



Figura 9 – Montagem experimental do processo de SPME com a fibra exposta

Após a conclusão do processo de SPME, recolheu-se a fibra e esta foi transferida para o injetor do GC, que se encontrava a uma temperatura de 40°C, e onde foi novamente exposta, e iniciou-se a cromatografia gasosa. A exposição da fibra no injetor durou cerca de 3 minutos antes de ser recolhida e sujeita novamente ao processo de dessorção térmica de forma a remover todos os compostos adsorvidos.

Os compostos voláteis foram detetados por um equipamento de GC-MS equipado com uma coluna DB-FFAP com as dimensões 30 m de comprimento x 0,025 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme, e com uma fase estacionária de polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico, com uma gama de temperaturas operacional entre os 40°C aos 250°C. Neste equipamento foram utilizados três programas de temperatura diferentes por forma a otimizar a separação cromatográfica: o primeiro, com uma subida constante desde os 40°C até aos 120°C com uma taxa de 2°C·min<sup>-1</sup>, e de seguida com uma taxa de 15°C·min<sup>-1</sup> até aos 220°C, mantendo o equipamento isotérmico durante 3 minutos. O segundo programa, contém uma subida constante desde os 40°C até aos 120°C com uma taxa de 3°C·min<sup>-1</sup>, e de seguida com uma taxa de 15°C·min<sup>-1</sup> até aos 220°C, mantendo o equipamento isotérmico durante 3 minutos. O terceiro contém uma subida constante desde os 40°C até aos 120°C com uma taxa de 5°C·min<sup>-1</sup>, e de seguida com uma taxa de 15°C·min<sup>-1</sup> até aos 220°C, mantendo o equipamento isotérmico durante 3 minutos.

Após a realização do processo de HS-SPME/GC-MS obtiveram-se os espectros de massa e cromatogramas respetivos a cada uma das amostras. A sua posterior análise permitiu a identificação de certos compostos voláteis, de acordo com o seu tempo de retenção na coluna cromatográfica e espectro de massa, e após a integração dos picos de cada composto foi também possível a determinação da sua área cromatográfica. A identificação dos compostos voláteis presentes, ou da sua estrutura, foi realizada recorrendo a dois métodos diferentes, das propostas estruturais fornecidas com base em dados dos espectros de massa e de uma comparação dos espectros de massa encontrados na literatura. [36], [37]



### 3.3. Análise sensorial

De forma a efetuar uma análise sensorial da cerveja *India Pale Ale* (IPA) foi elaborado um questionário (Figura 10) de forma a ser respondido durante uma sessão de provas descritiva de ordenação, que teve como objetivo comparar e classificar as várias amostras retiradas durante o processo de *dry-hopping*. O painel de provadores, constituído por consumidores regulares de cerveja artesanal e por consumidores experientes em análises sensoriais, incluindo um *beer sommelier*, especialista em provas e degustação de cerveja, classificou as amostras relativamente aos parâmetros presentes no questionário numa escala de 1 a 5, onde 1 correspondia à menor presença da característica referida e 5 à maior presença. As características analisadas foram as seguintes:

- a) Presença de aroma “resinoso”;
- b) Presença de aroma frutado;
- c) Presença de amargor;
- d) Prolongamento do sabor amargo;
- e) Presença de sabor frutado.

As amostras foram identificadas com um código em função do tempo de duração do processo (Tabela 6), de forma a que a classificação por parte do painel de provadores não fosse influenciada pelo conhecimento do tempo de *dry-hopping*.

*Tabela 6 – Identificação das amostras em função do tempo de dry-hopping*

Código	Duração do <i>dry-hopping</i> (h)
101	10,75
201	6,75
301	4,5
401	2
501	Antes do início do processo

## Questionário de prova (Teste de cotação de amostras)

Data:

Este teste tem como objetivo comparar e classificar várias amostras retiradas da cerveja da variedade IPA, durante o processo de *dry-hopping*. Para tal, pede-se ao conjunto de provadores que classifiquem as amostras numa escala de 1 a 5 (sem repetição de valores), onde 1 corresponde à menor presença da característica referida e 5 à maior presença. Leia todos os parâmetros com atenção.

Características	Código das amostras				
Presença de aroma "resinoso"					
Presença de aroma frutado					
Presença de amargor					
Prolongamento do sabor amargo					
Presença de sabor frutado					
Turbidez					

Possíveis comentários acerca das amostras degustadas:

Código	Comentário

Figura 10 – Questionário de prova utilizado na análise sensorial da cerveja IPA

## 4. Apresentação e discussão de resultados

### 4.1. Análise da composição volátil

#### 4.1.1. Lúpulo *Simcoe*

As amostras de lúpulo foram analisadas pela metodologia de HS-SPME/GC-MS de forma a obter o perfil de compostos voláteis. Nas Figuras 11 e 12 encontram-se os cromatogramas obtidos e na Tabela 7 estão presentes os compostos voláteis encontrados nas amostras de lúpulo utilizado para o processo de *dry-hopping* da cerveja *German Pilsner*. Os tempos de retenção para os mesmos compostos são diferentes pois na amostra de lúpulo fresco foi utilizado um programa de temperaturas diferente para o processo de cromatografia gasosa, uma subida constante desde os 40°C até aos 120°C com uma taxa de 5°C·min<sup>-1</sup>, e de seguida com uma taxa de 15°C·min<sup>-1</sup> até aos 220°C, mantendo o equipamento isotérmico durante 3 minutos.

Tabela 7 - Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de lúpulo em pellets, do seu tempo de retenção e abundância

Composto	Nº pico	Lúpulo fresco		Lúpulo usado	
		t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área
β-Pineno	1	3,20	1,97×10 <sup>7</sup>	3,47	2,44×10 <sup>7</sup>
Mirceno	2	4,18	1,35×10 <sup>9</sup>	4,55	3,32×10 <sup>8</sup>
Limoneno	3	4,64	1,89×10 <sup>8</sup>	5,01	7,51×10 <sup>7</sup>
Linalol	4	12,88	2,56×10 <sup>8</sup>	17,92	1,13×10 <sup>8</sup>
β-Cariofileno	5	13,19	8,80×10 <sup>7</sup>	18,41	5,14×10 <sup>8</sup>
α-Humuleno	6	15,31	1,92×10 <sup>9</sup>	21,28	1,27×10 <sup>9</sup>
<i>E</i> -Citral		16,84	3,42×10 <sup>6</sup>	24,11	3,03×10 <sup>7</sup>
δ-Cadineno	7	17,19	2,34×10 <sup>8</sup>	24,69	6,47×10 <sup>7</sup>
Nerol		18,39	6,10×10 <sup>6</sup>	26,82	5,24×10 <sup>6</sup>
Geraniol	8	19,43	4,38×10 <sup>7</sup>	28,56	1,82×10 <sup>7</sup>
Álcool feniletílico	9	20,63	7,47×10 <sup>6</sup>	30,32	3,49×10 <sup>7</sup>
α-Cadinol		25,35	1,73×10 <sup>6</sup>		

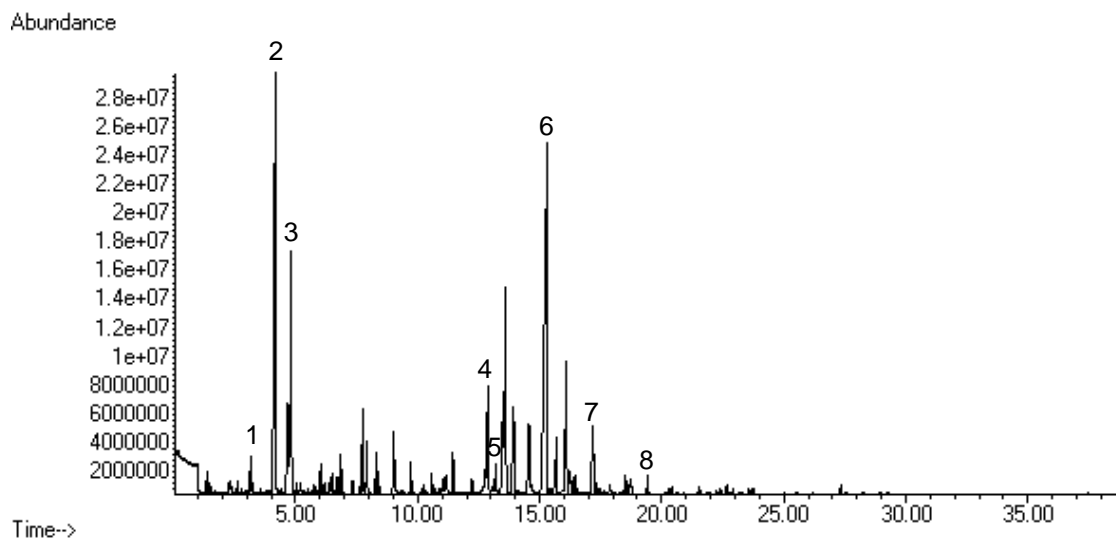


Figura 11 - Cromatograma da amostra de lúpulo fresco

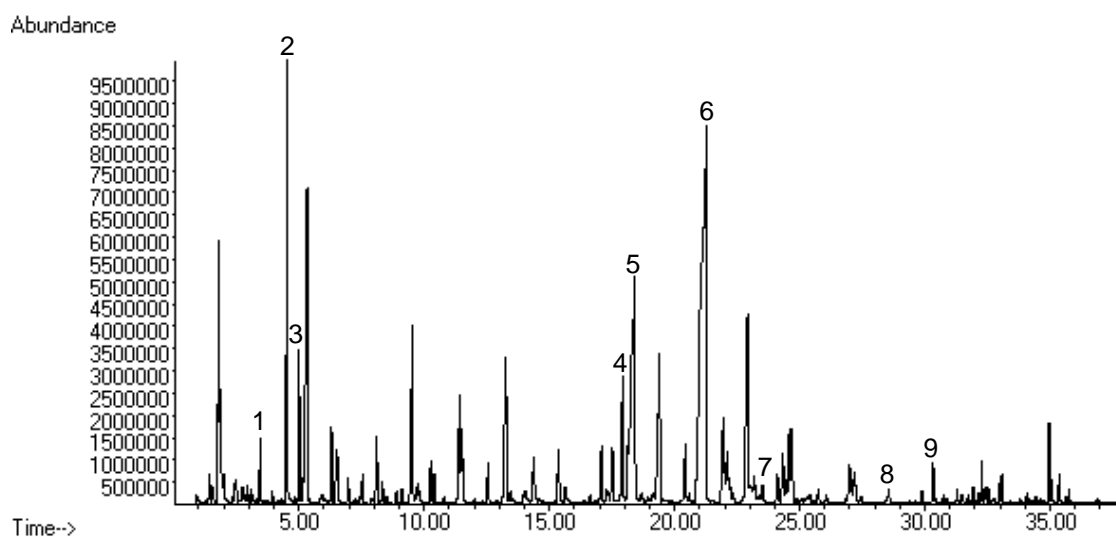


Figura 12 - Cromatograma da amostra de lúpulo usado

Após a realização das análises verificou-se que os monoterpenóides, sesquiterpenóides e álcoois aromáticos são os grupos químicos de compostos que constituem a composição volátil das amostras em estudo. Foram encontrados cerca de 12 compostos, na sua maioria monoterpenóides, como o  $\beta$ -pineno, o mirceno, o limoneno, o linalol, o nerol, o geraniol e o *E*-cital (respetivamente 3 monoterpenos, 3 monoterpenóis e um aldeído monoterpénico). Para além disto, foi ainda determinada a presença de sesquiterpenóides, como o  $\beta$ -cariofileno, o  $\alpha$ -humuleno, o  $\delta$ -cadineno e o  $\alpha$ -cadinol, e de um álcool aromático, o álcool feniletílico. [36], [37]

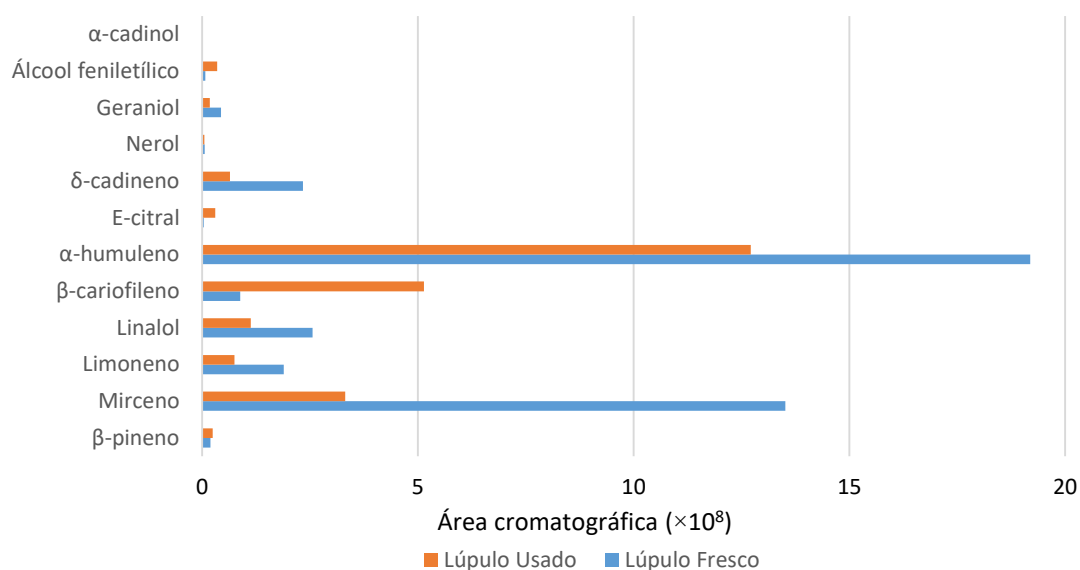


Figura 13 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas amostras de lúpulo

Apesar das quantidades dos compostos referenciados presentes no lúpulo usado necessitarem de ser ajustados para refletir a perda de sólidos solúveis, é possível realizar uma comparação entre as amostras em estudo. Na Figura 13 verifica-se que existe uma variação de compostos com mais abundância entre as amostras. No caso do lúpulo fresco compostos como o  $\alpha$ -humuleno, o mirceno, o linalol e o  $\delta$ -cadineno são os compostos com maior abundância, em ordem decrescente, enquanto que no lúpulo usado estão em maior abundância o  $\alpha$ -humuleno, o  $\beta$ -cariofileno, o mirceno e o linalol. [38]

Verifica-se também que no caso do  $\beta$ -cariofileno, do  $\beta$ -pineno, do *E*-citral e do álcool feniletílico houve um aumento da abundância ao longo do processo de *dry-hopping*, ou seja, existiu uma transferência dos compostos da cerveja para o lúpulo. Isto pode ser explicado pelo excessivo tempo de residência do processo, que provoca uma migração dos compostos da cerveja para o lúpulo, no entanto, os três primeiros compostos referenciados não se encontram presentes na cerveja antes do processo. [29]

Para o caso do lúpulo usado, observa-se que a abundância dos compostos ainda presentes é relativamente elevada, sendo possível a reutilização deste produto para um novo processo de *dry-hopping* para o mesmo estilo de cerveja.

## 4.1.2. Cerveja *German Pilsner*

As amostras da cerveja *German Pilsner* foram analisadas pela metodologia de HS-SPME/GC-MS para avaliar o perfil de compostos voláteis. Para cada uma das amostras foram realizados dois ensaios, sendo que de seguida foi determinada a abundância média dos compostos encontrados. Nas Figuras 14 e 15 encontram-se os cromatogramas obtidos e na Tabela 8 encontram-se os compostos presentes na amostra de cerveja *German Pilsner*, antes do processo de *dry-hopping*, bem como a sua abundância média.

Tabela 8 – Identificação de compostos voláteis presentes na amostra de cerveja *German Pilsner* sem *dry-hopping* do seu tempo de retenção e abundância

Composto	Nº pico	Réplica 1		Réplica 2		Média
		t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área	
Mirceno	1	4,74	6,47×10 <sup>6</sup>	4,69	5,24×10 <sup>6</sup>	5,86×10 <sup>6</sup>
Limoneno	2	5,42	2,66×10 <sup>7</sup>	5,37	2,11×10 <sup>7</sup>	2,39×10 <sup>7</sup>
Linalol	3	17,92	4,45×10 <sup>7</sup>	17,92	4,83×10 <sup>7</sup>	4,64×10 <sup>7</sup>
α-Humuleno		21,20	9,90×10 <sup>5</sup>	21,18	2,00×10 <sup>6</sup>	1,50×10 <sup>6</sup>
Citronelol		25,81	4,08×10 <sup>6</sup>	25,81	4,47×10 <sup>6</sup>	4,28×10 <sup>6</sup>
Geraniol		28,58	1,90×10 <sup>6</sup>	28,61	2,18×10 <sup>5</sup>	1,06×10 <sup>6</sup>
Álcool feniletílico	4	30,34	2,50×10 <sup>8</sup>	30,35	3,06×10 <sup>8</sup>	2,78×10 <sup>8</sup>

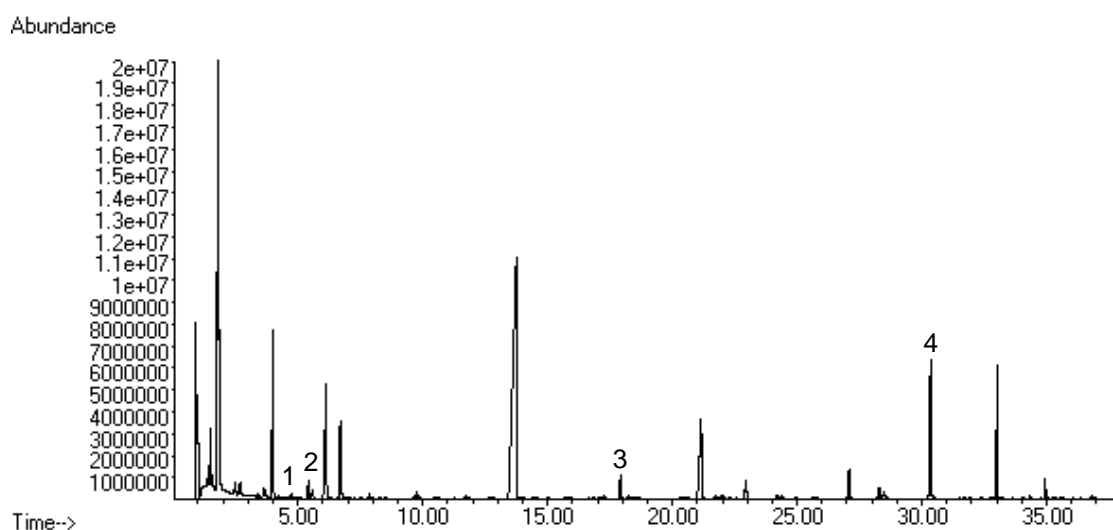


Figura 14 - Cromatograma da réplica 1 da amostra cerveja *German Pilsner* sem *dry-hopping*

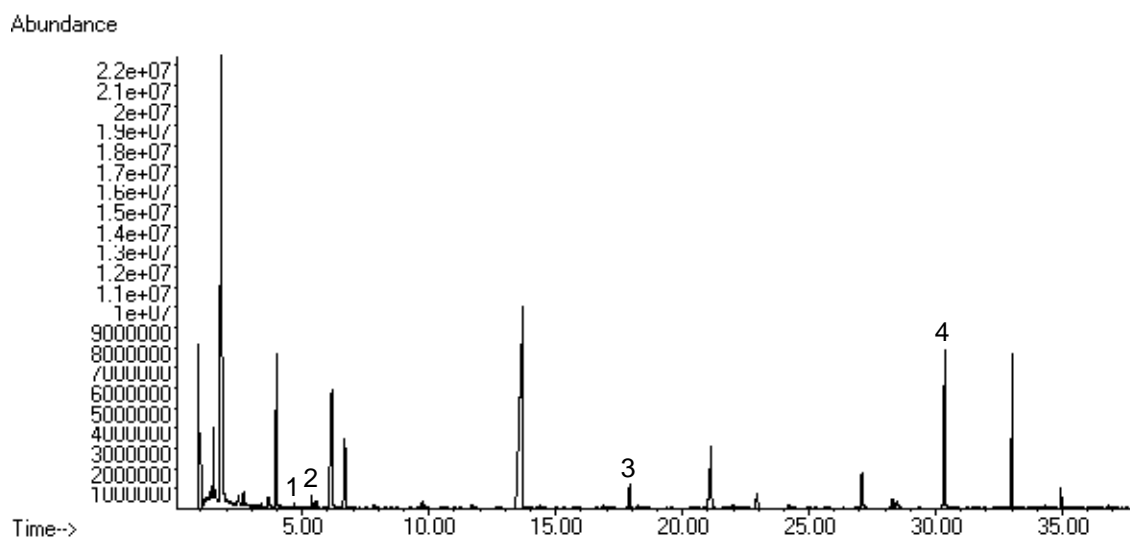


Figura 15 - Cromatografia da réplica 2 da amostra cerveja German Pilsner sem dry-hopping

Através das análises realizadas é possível verificar que os monoterpênóides, sesquiterpênóides e álcoois aromáticos são as famílias de compostos que constituem a composição volátil da amostra em estudo. Foram determinados 7 compostos, na maioria monoterpênóis, como o linalol, o citronelol e o geraniol. Para além destes, verificou-se também a existência de monoterpênos, o mirceno e o limoneno, um sesquiterpeno, o  $\alpha$ -humuleno e por último um álcool aromático, o álcool feniletílico. [36], [37]

Tabela 9 - Identificação de compostos voláteis presentes na amostra de cerveja German Pilsner com dry-hopping, do seu tempo de retenção e abundância

Composto	Nº pico	Réplica 1		Réplica 2		Média
		t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área	
Mirceno	1	4,74	1,51×10 <sup>7</sup>	4,73	1,57×10 <sup>7</sup>	1,54×10 <sup>7</sup>
Limoneno	2	5,42	1,19×10 <sup>7</sup>	5,41	2,23×10 <sup>7</sup>	1,71×10 <sup>7</sup>
Linalol	3	17,93	5,26×10 <sup>7</sup>	17,93	5,12×10 <sup>7</sup>	5,19×10 <sup>7</sup>
$\alpha$ -Humuleno		21,17	4,12×10 <sup>6</sup>	21,17	4,06×10 <sup>6</sup>	4,09×10 <sup>6</sup>
$\delta$ -Cadineno		24,64	1,42×10 <sup>5</sup>	24,64	1,42×10 <sup>5</sup>	1,42×10 <sup>5</sup>
Citronelol		25,81	4,56×10 <sup>6</sup>	25,81	2,69×10 <sup>6</sup>	3,63×10 <sup>6</sup>
Geraniol		28,57	7,52×10 <sup>5</sup>	28,60	3,88×10 <sup>5</sup>	5,70×10 <sup>5</sup>
Álcool feniletílico	4	30,35	3,02×10 <sup>8</sup>	30,35	2,55×10 <sup>8</sup>	2,78×10 <sup>8</sup>

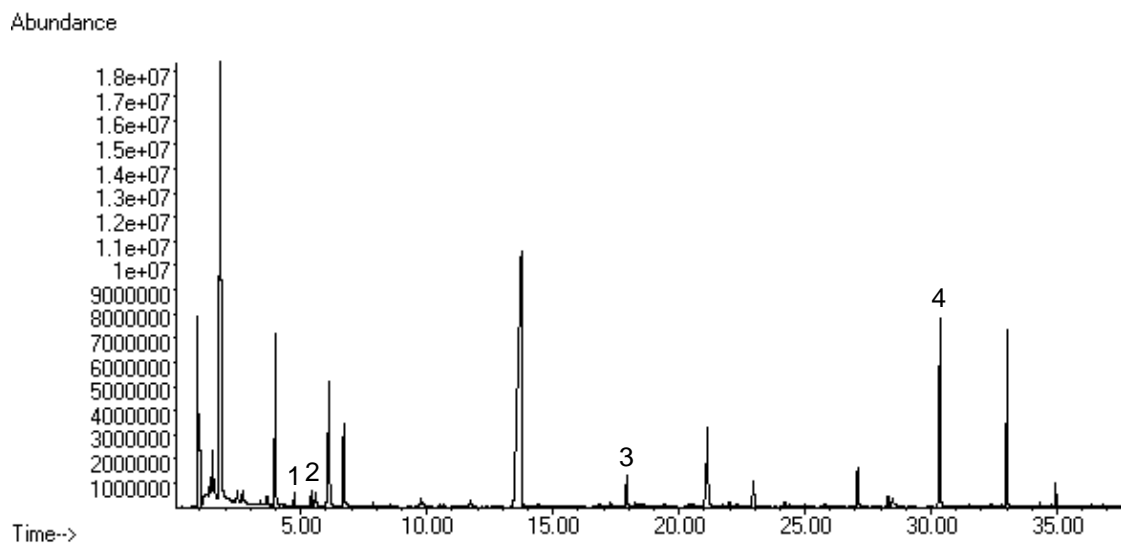


Figura 16 - Cromatograma da réplica 1 da amostra cerveja German Pilsner com dry-hopping

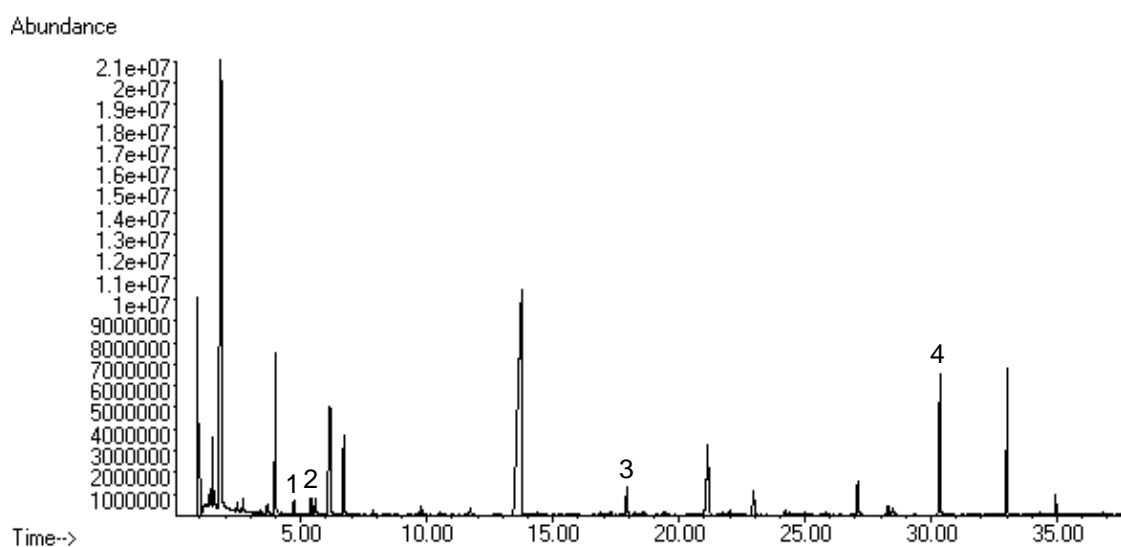


Figura 17 - Cromatografia da réplica 2 da amostra cerveja German Pilsner com dry-hopping

Nas Figuras 16 e 17 encontram-se os cromatogramas obtidos e na Tabela 9 encontram-se os compostos presentes na amostra de cerveja após o processo de *dry-hopping*, bem como a sua abundância média. Comparando os compostos voláteis presentes nesta amostra com os presentes na anterior, verifica-se o aparecimento de apenas um sesquiterpenóide, o  $\delta$ -cadineno, ou seja, durante a ocorrência do processo em estudo apenas existiu a transferência de um novo composto para o produto final. Verifica-se então, que os componentes presentes em maior número são os monoterpênicos e monoterpênicos, o que vai ao encontro de resultados encontrados na literatura. [25], [26], [37]



Observa-se que grande parte dos compostos voláteis que conferem aroma estão presentes na amostra que não sofreu *dry-hopping*. Isto acontece devido à adição de lúpulo na fase final da ebulição que contribui para o fornecimento destes compostos, sendo que o tempo a que estão expostos às altas temperaturas não é suficiente para os remover completamente. [39]

Através da Figura 18 verifica-se que o álcool feniletílico, o linalol, o limoneno e o mirceno são os compostos que estão presentes em maior abundância nas amostras analisadas.

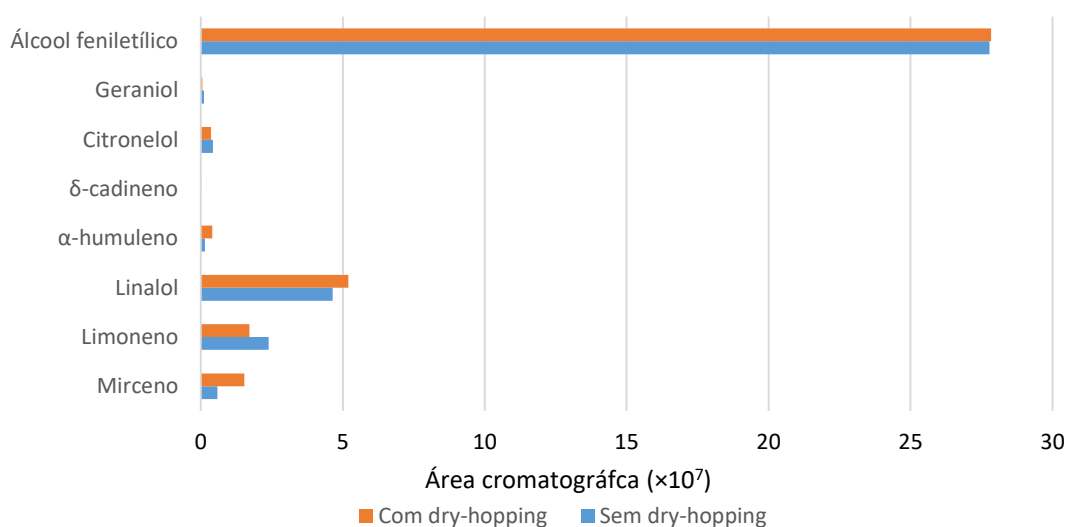


Figura 18 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas amostras da cerveja German Pilsner

Relativamente ao citronelol observa-se que a abundância deste é maior na cerveja que não sofreu o processo de *dry-hopping*. O citronelol é um composto volátil de aroma que normalmente não está presente no lúpulo, apenas na cerveja. A sua formação ocorre na etapa de fermentação do mosto, através da biotransformação do geraniol em citronelol através da ação das leveduras. Nesta fase, a concentração de geraniol, que provém da adição de lúpulo da fase de ebulição do processo cervejeiro, diminui drasticamente. [40]

Verifica-se que o limoneno e o geraniol possuem abundâncias maiores nas amostras que não passaram pelo processo em estudo. Para os restantes componentes, verifica-se o contrário, a existência do aumento da abundância dos mesmos com a realização do *dry-hopping*. No entanto, quer a diminuição e o aumento dos compostos não ocorreram de forma significativa.

Comparando os resultados das análises realizadas ao lúpulo utilizado durante o *dry-hopping* com os resultados da cerveja que sofreu o processo, verificou-se que apenas existiu a transferência de um novo composto, o  $\delta$ -cadineno, para o produto final, e observou-se também a transferência de outros compostos que já existiam previamente na cerveja e aumentaram a sua abundância (por exemplo o mirceno e linalol). Para além disto, é possível constatar que no caso do limoneno e do geraniol, em ambas as amostras, lúpulo e cerveja, as abundâncias destes diminuíram, significando que existiu uma perda destes componentes por volatilização, que pode ter acontecido durante o próprio processo ou durante o armazenamento das amostras. Verificou-se também a existência de certos compostos presentes apenas no lúpulo que diminuíram a sua abundância ao longo do processo (por exemplo o nerol), mas não se encontram presentes no produto final.

Tabela 10 – Descritores de aroma dos compostos voláteis presentes nas amostras de lúpulo e cerveja German Pilsner

Composto	Descritor de aroma	Limites de perceção sensorial em cerveja
$\beta$ -pineno	Pinho, picante <sup>[11]</sup>	
Mirceno	Resinoso, herbáceo <sup>[39]</sup>	30-1000 mg/L <sup>[20]</sup>
Limoneno	Cítrico, laranja <sup>[20]</sup>	
Linalol	Floral, laranja <sup>[41]</sup>	8-80 mg/L <sup>[20]</sup>
$\beta$ -cariofileno	Madeira, herbáceo <sup>[27], [39]</sup>	230 $\mu$ g/L <sup>[26]</sup>
$\alpha$ -humuleno	Madeira, pinho <sup>[41]</sup>	450 $\mu$ g/L <sup>[26]</sup>
<i>E</i> -citral	Limão, cítrico doce <sup>[11]</sup>	
$\delta$ -cadineno	Madeira, herbáceo <sup>[25]</sup>	
Citronelol	Frutado, cítrico <sup>[39]</sup>	9 $\mu$ g/L <sup>[26]</sup>
Nerol	Rosas, cítrico <sup>[20]</sup>	1200 $\mu$ g/L <sup>[20]</sup>
Geraniol	Floral, doce, rosas <sup>[41]</sup>	4-40 mg/L <sup>[20]</sup>
Álcool feniletílico	Floral, rosa <sup>[11]</sup>	
$\alpha$ -cadinol	Frutado <sup>[41]</sup>	

Na Tabela 10 estão presentes os descritores de aroma dos compostos presentes nas amostras da cerveja *German Pilsner* e no lúpulo utilizado para o processo de *dry-hopping* da respetiva cerveja. Observa-se que a maioria destes é capaz de conferir à cerveja aromas florais e frutados, nomeadamente cítricos. No entanto existem também compostos que conferem ao produto final um carácter resinoso, herbáceo e a pinho estando também evidente um carácter a madeira. [20], [39], [41]

### 4.1.3. Cerveja *India Pale Ale* (IPA)

As amostras da cerveja IPA foram submetidas ao processo de HS-SPME/GC-MS de forma a analisar a presença de compostos voláteis que possam contribuir para o aroma. Da Figura 19 à Figura 23 encontram-se os cromatogramas obtidos e nas Tabela 11 e 12 encontram-se os compostos presentes na amostra de cerveja.

Tabela 11 – Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja IPA antes do início do dry-hopping e após 2 e 4,5 horas após o início do mesmo, tempo de retenção e abundância

Composto	Nº pico	Amostra antes dry-hopping		Amostra 2h após início		Amostra 4,5h após início	
		t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área
Mirceno	1	4,89	5,25×10 <sup>6</sup>	4,60	3,83×10 <sup>6</sup>	4,56	5,04×10 <sup>6</sup>
Limoneno	2			5,27	3,02×10 <sup>6</sup>	5,21	1,22×10 <sup>6</sup>
α-Pineno		7,21	6,67×10 <sup>5</sup>	6,50	4,07×10 <sup>5</sup>	6,46	5,63×10 <sup>5</sup>
Ocimeno				7,01	1,48×10 <sup>6</sup>	6,98	1,35×10 <sup>6</sup>
δ-Careno		7,84	1,00×10 <sup>6</sup>				
Linalol	3	23,14	9,87×10 <sup>7</sup>	17,93	1,04×10 <sup>8</sup>	17,94	1,44×10 <sup>8</sup>
α-Terpineol		30,36	3,84×10 <sup>6</sup>	19,39	4,78×10 <sup>5</sup>	19,38	4,25×10 <sup>6</sup>
Citronelol	4			25,82	1,61×10 <sup>7</sup>	25,81	2,15×10 <sup>7</sup>
Geraniol	5	38,77	7,18×10 <sup>6</sup>	28,59	1,02×10 <sup>6</sup>	28,59	1,07×10 <sup>7</sup>
Álcool feniletílico	6	40,95	2,17×10 <sup>8</sup>	30,34	1,97×10 <sup>8</sup>	30,35	3,04×10 <sup>8</sup>
δ-Cadinol		45,23	8,24×10 <sup>5</sup>				

Tabela 12 - Identificação de compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja IPA 6,75 e 10,75 horas após o início do dry-hopping, tempo de retenção e abundância

Composto	Nº pico	Amostra 6,75h após início		Amostra após dry-hopping	
		t <sub>retenção</sub> (min)	Área	t <sub>retenção</sub> (min)	Área
Mirceno		4,69	4,53×10 <sup>6</sup>	4,68	5,37×10 <sup>6</sup>
Limoneno		5,37	1,92×10 <sup>6</sup>	5,37	1,11×10 <sup>6</sup>
α-Pineno		6,60	8,29×10 <sup>5</sup>	6,57	1,62×10 <sup>5</sup>
Ocimeno		7,08	2,96×10 <sup>6</sup>	7,07	1,79×10 <sup>6</sup>
δ-Careno					
Linalol	3	17,95	1,15×10 <sup>8</sup>	17,95	1,39×10 <sup>8</sup>
α-Terpineol		19,39	1,21×10 <sup>6</sup>	19,39	2,89×10 <sup>6</sup>
Citronelol	4	25,82	1,55×10 <sup>7</sup>	25,81	1,77×10 <sup>7</sup>
Geraniol	5	28,57	7,85×10 <sup>6</sup>	28,58	9,22×10 <sup>6</sup>
Álcool feniletílico	6	30,34	1,99×10 <sup>8</sup>	30,35	2,73×10 <sup>8</sup>
δ-Cadinol					

De salientar que os tempos de retenção dos compostos da amostra sem *dry-hopping*, são relativamente superiores aos tempos das restantes amostras, pois neste ensaio foi utilizado um programa de temperaturas diferente para a cromatografia gasosa, uma subida constante desde os 40°C até aos 120°C com uma taxa de 2°C·min<sup>-1</sup>, e de seguida com uma taxa de 15°C·min<sup>-1</sup> até aos 220°C, mantendo o equipamento isotérmico durante 3 minutos, de forma a otimizar o programa de temperaturas.

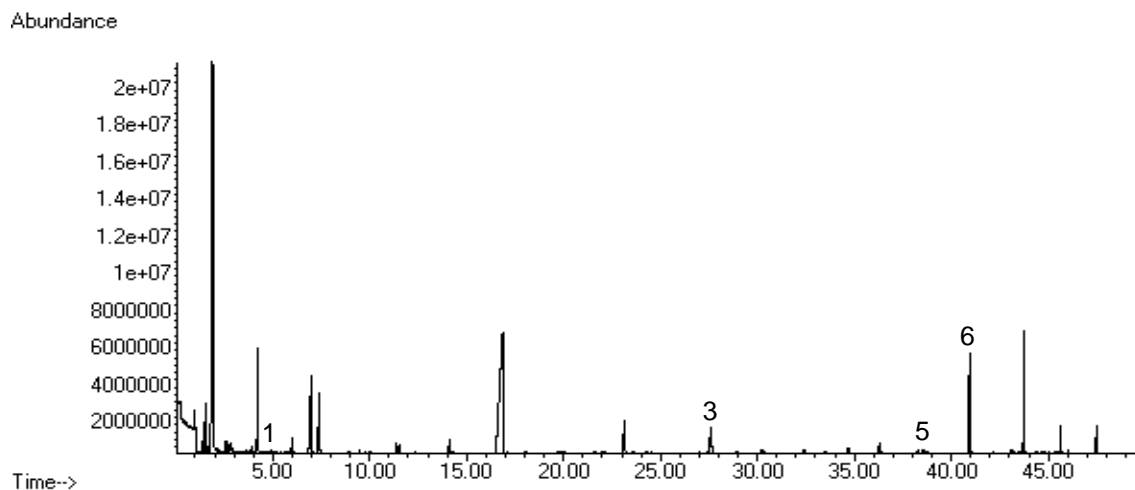


Figura 19 – Cromatograma da amostra de cerveja IPA antes do início de dry-hopping

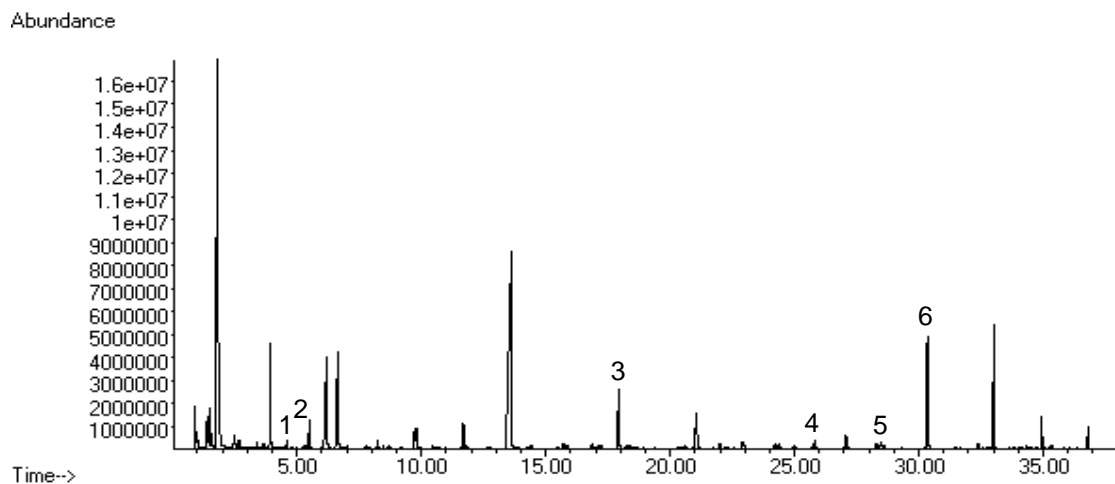


Figura 20 - Cromatograma da amostra da cerveja IPA 2 horas após o início do processo de dry-hopping

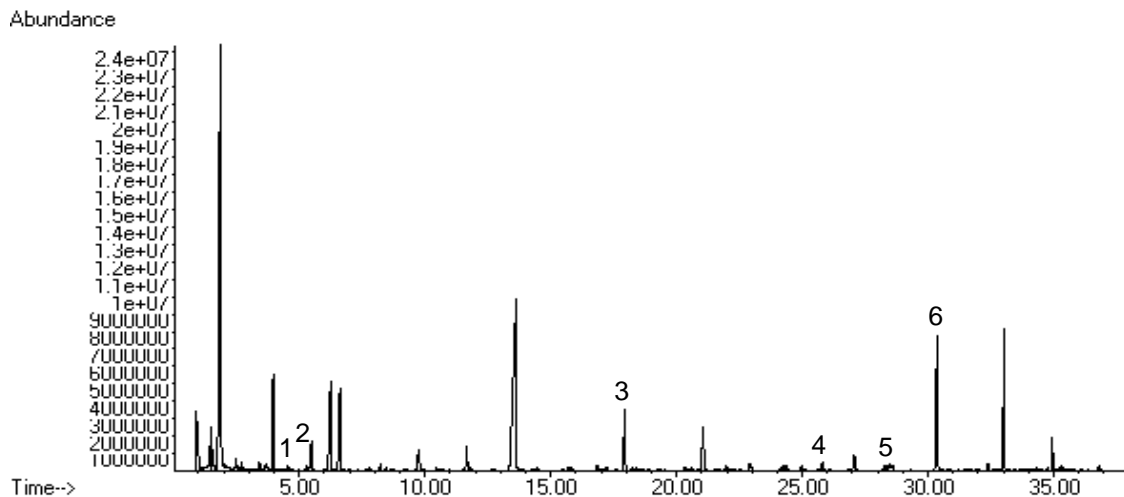


Figura 21 – Cromatograma da amostra de cerveja IPA 4,5 horas após o início de dry-hopping

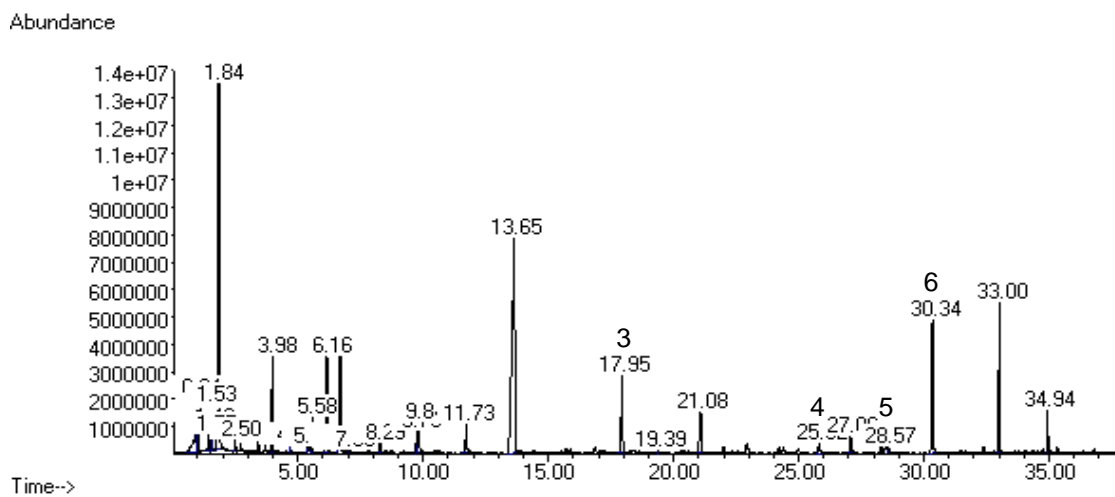


Figura 22 - Cromatograma da amostra de cerveja IPA 6,75 horas após o início de dry-hopping, com respetiva integração

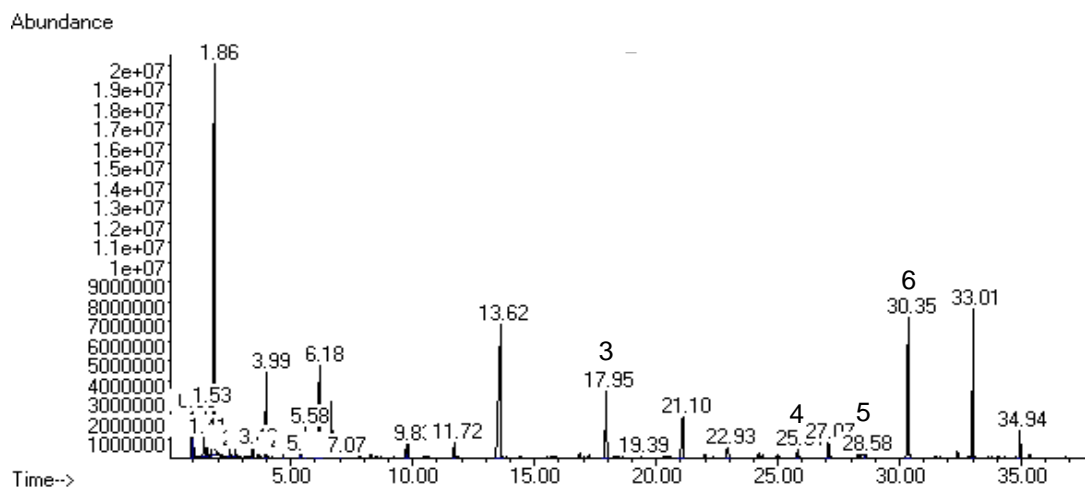


Figura 23 - Cromatograma da amostra de cerveja IPA 10,75 horas após o início de dry-hopping, com respetiva integração

As análises realizadas mostram que os monoterpenóides, sesquiterpenóides e álcoois aromáticos são as famílias de compostos que constituem a composição volátil da cerveja em estudo. Foram determinados 11 compostos, sendo que estes são na sua maioria monoterpenos, incluindo o mirceno, o limoneno, o  $\alpha$ -pineno, o ocimeno e o  $\delta$ -careno. Em grande número existem também os monoterpenóis, dos quais fazem parte o linalol, o  $\alpha$ -terpineol, o citronelol e o geraniol. Restam ainda dois compostos, um álcool aromático, o álcool feniletílico, e um sesquiterpenol,  $\delta$ -cadinol. Mais uma vez estes resultados vão ao encontro aos presentes na literatura, mostrando que os monoterpenos e monoterpenóis são os compostos presentes em maior número na cerveja [25], [26], [36], [37]

Verifica-se a existência de um grande número de compostos voláteis na amostra sem ocorrência de *dry-hopping*, o que indica que adição de lúpulo na fase final da ebulição, ou no *Whirlpool* (equipamento utilizado na produção cervejeira para decantar partículas sólidas após a ebulição), não contribui apenas para adição de amargor, através da isomerização dos  $\alpha$ -ácidos, mas fornece também compostos capazes de conferir ao produto final aroma e sabor. Esta contribuição acontece devido ao facto de o tempo a que os compostos foram expostos às altas temperaturas não ser suficiente para os arrastar completamente com a corrente de vapor. [20], [39]

Verifica-se também que alguns compostos ( $\delta$ -careno e  $\delta$ -cadinol) encontram-se apenas na amostra retirada antes do início do processo, isto pode ser explicado através da coeluição destes compostos noutros, à medida que a abundância destes vai aumentando ao longo do *dry-hopping*. Por outro lado, certos compostos como o limoneno e o ocimeno estão presentes apenas após o início do referido processo.

Através da análise da Figura 24 verifica-se que o álcool feniletílico, juntamente com o linalol são os compostos voláteis que estão presentes em maior abundância em todas as amostras analisadas. Observa-se também, que para estes compostos existe uma abundância maior na amostra retirada 4,5 horas após o início do processo.

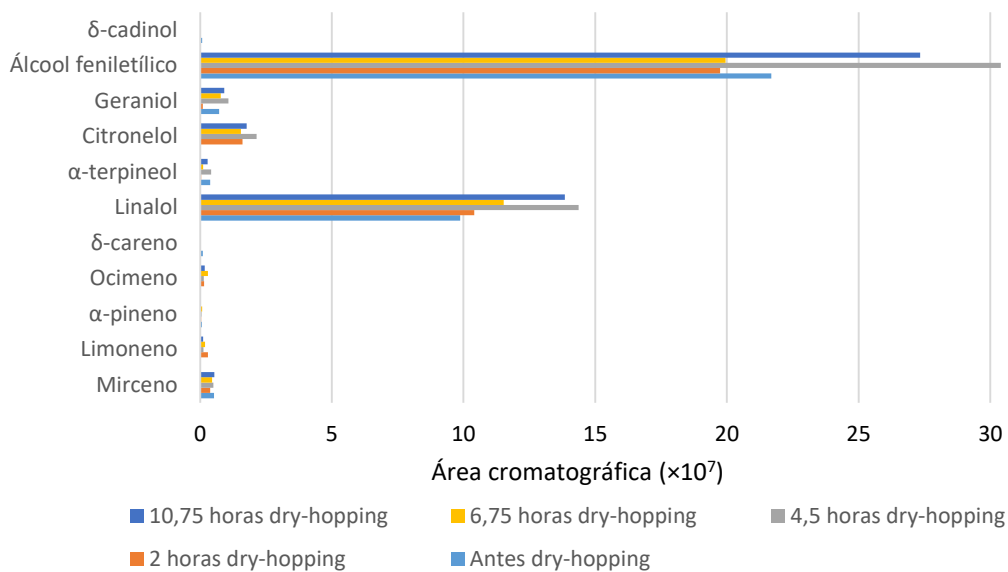


Figura 19 - Comparação das abundâncias dos compostos voláteis nas várias amostras da cerveja IPA

Na Figura 25 está presente a evolução da abundância de cada um dos compostos existentes nas amostras analisadas e respetivos desvios padrão. De um modo geral verifica-se que a abundância dos compostos no final do *dry-hopping* é maior do que aquela apresentada antes do início do mesmo. Isto apenas não se verifica para os casos do  $\alpha$ -pineno e do  $\alpha$ -terpineol, em que as suas abundâncias finais são menores relativamente às iniciais. Esta perda pode dever-se ao facto de o tempo de residência do processo ser demasiado elevado para ambos os compostos. No caso do  $\alpha$ -terpineol, um dos motivos para ocorrer este fenómeno passa por este composto ser um subproduto da transformação do linalol pelo metabolismo das leveduras presentes na fermentação. [26], [29]

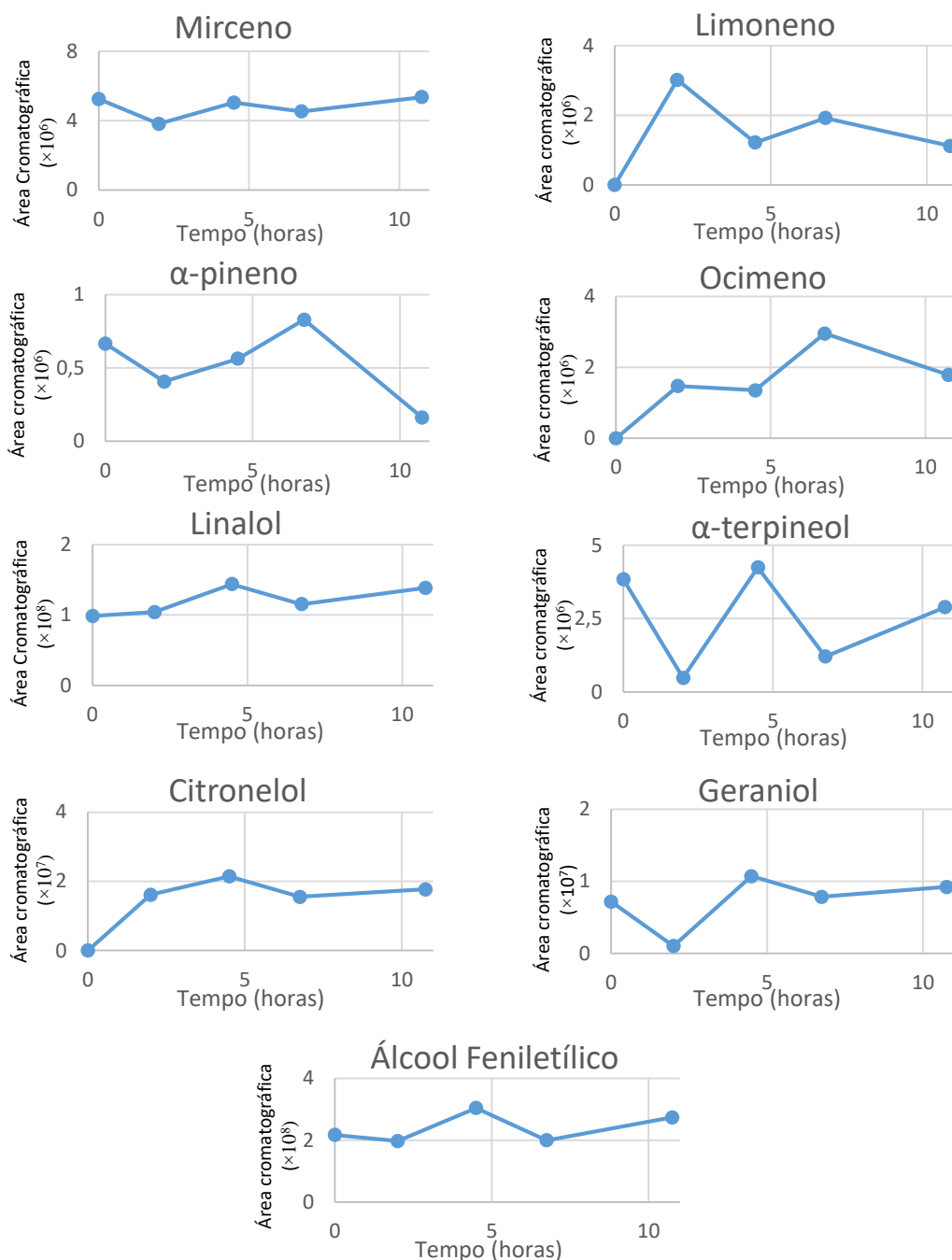


Figura 20 - Variação da abundância dos compostos voláteis ao longo do dry-hopping

Verifica-se também que para todos compostos que a abundância final não corresponde ao maior valor, ou seja, durante o processo, mais concretamente nas primeiras 4,5 horas, cada composto atinge o seu máximo de abundância, sendo que de seguida esse valor diminui e se mantém sem grandes variações. A hidrofobicidade de alguns destes compostos, que causa a sua participação entre a cerveja e o lúpulo, pode ser uma hipótese para a ocorrência deste fenómeno. As



exceções são o  $\alpha$ -pineno e o ocimeno, em que as suas abundâncias máximas se apresentam nas últimas horas do processo.

O linalol é um dos compostos com maior abundância antes do início do processo em estudo, porém, é também dos compostos que mais aumenta esse valor ao longo do mesmo. Isto deve-se ao facto de o linalol, um terpenol, ter uma maior solubilidade (em água, 1,59 mg/mL a 25°C<sup>[42]</sup>) e menor coeficiente de partição octanol/água ( $\log_{K_{ow}}=2,97$ <sup>[42]</sup>) que permite se dissolver na cerveja de maneira mais fácil quando comparado a outros compostos, como por exemplo o mirceno (solubilidade em água 0,0056 mg/mL a 25°C<sup>[43]</sup> e  $\log_{K_{ow}}=4,17$ <sup>[43]</sup>), um terpeno, mais apolar, tendo uma menor variação ao longo do tempo. No entanto, tempos de residência de *dry-hopping* demasiado prolongados podem levar a uma perda de concentração de linalol. [29], [38], [44]

No caso do citronelol, verifica-se, pela análise da figura, o aparecimento deste apenas após o início do processo. Ou seja, espera-se que o aparecimento deste na cerveja seja devido à transferência do componente do lúpulo para o produto final. No entanto, tal como o explicado anteriormente, o citronelol é um composto que não se encontra presente no lúpulo, a sua formação advém de uma biotransformação do geraniol, transferido para o mosto durante a fase de ebulição do processo cervejeiro, através da ação das leveduras que intervêm na fermentação do mosto. Desta forma é possível explicar a abundância relativamente constante do citronelol durante o *dry-hopping*, sendo que o não aparecimento do composto na amostra antes do início do processo pode dever-se a um problema de coeluição ou uma não deteção do composto nos cromatogramas e espectros de massa da respetiva amostra. [40]

A presença de linalol nas amostras pode funcionar como um potenciador de sabor, ou seja, a intensidade de sabor de compostos como o geraniol e o citronelol é potenciada quando o linalol está igualmente presente, sendo que o produto final adquire um sabor semelhante a lima com a coexistência destes três monoterpenóis, sendo dos maiores contribuidores para o designado “*hoppy*” aroma. Por outro lado, existem compostos que não apresentam grande contribuição para o aroma do produto final, caso do mirceno. [38], [40]

Tabela 13 – Descritores de aroma dos compostos voláteis presentes nas amostras analisadas

Composto	Descritor de aroma	Limites de percepção sensorial em cerveja
Mirceno	Resinoso, herbáceo <sup>[39]</sup>	30-1000 mg/L <sup>[20]</sup>
Limoneno	Cítrico, laranja <sup>[20]</sup>	
$\alpha$ -pineno	Pinho, herbáceo <sup>[11]</sup>	
Ocimeno	Herbáceo doce <sup>[20]</sup>	
$\delta$ -careno	Doce <sup>[39]</sup>	
Linalol	Floral, laranja <sup>[41]</sup>	8-80 mg/L <sup>[20]</sup>
$\alpha$ -terpineol	Floral, lilás <sup>[41]</sup>	450 $\mu$ g/L <sup>[26]</sup>
Citronelol	Frutado, cítrico <sup>[39]</sup>	9 $\mu$ g/L <sup>[26]</sup>
Geraniol	Floral, doce, rosas <sup>[41]</sup>	4-40 mg/L <sup>[20]</sup>
Álcool feniletílico	Floral, rosa <sup>[11]</sup>	
$\delta$ -cadinol	Frutado <sup>[41]</sup>	

Na Tabela 13 estão presentes as características aromáticas dos compostos presentes nas amostras da cerveja IPA. Observa-se que a maioria destes é capaz de conferir à cerveja aromas florais e frutados, nomeadamente cítricos. No entanto existem também compostos que conferem ao produto final um carácter resinoso, herbáceo e a pinho. [20], [39], [41]

## 4.2. Análise sensorial

Das provas sensoriais descritivas realizadas pelo provador experiente da empresa, durante a fase de maturação da cerveja IPA foi possível obter a seguinte evolução das características de aroma e sabor, presentes na Tabela 14.

Tabela 14 – Provas sensoriais à cerveja IPA durante a fase de maturação após dry-hopping

Dias após <i>dry-hopping</i>	Aroma	Sabor
2	Existência de um aroma resinoso	Amargor intenso e prolongado Não existe sabor floral ou a fruta
5	Aroma resinoso permanece, mas menos intenso Leves aromas a fruta	Amargor intenso e mais prolongado que a última prova Sem sabor floral ou a fruta

7	Aroma resinoso cada vez menos intenso Aromas frutados cada vez mais acentuados	Sabor amargo menos intenso e menos prolongado Sabor a fruta perceptível
9	Aromas frutados acentuados (ligeiro aroma a maracujá) Ligeiro aroma resinoso	Amargor prevalece, mas menos intenso e menos prolongado Sabores frutados mais perceptíveis
12	Aroma frutado bastante acentuado Ligeiro aroma resinoso	Existência de amargor, mas este é suave e prolongado Fortes sabores frutados, incluindo um ligeiro sabor ácido e resinoso

Verifica-se que as características organoléticas pretendidas pela empresa para este estilo de cerveja, que passam por um aroma frutado bastante perceptível, existência de um amargor suave e fortes sabores frutados, não se encontram sensorialmente perceptíveis logo após o fim do *dry-hopping*, sendo que estas se vão acentuando ao longo do período normal de maturação do produto. Isto acontece uma vez que o processo em estudo permite aumentar a estabilidade de sabor da cerveja. Nos primeiros dias após o processo verifica-se uma grande intensidade de amargor, devido à extração de  $\alpha$ -ácidos oxidados, que são bastante solúveis, e também à presença de compostos voláteis de aroma e compostos polifenólicos que podem realçar a percepção da intensidade do amargor. No entanto com o decorrer da maturação, o amargor torna-se cada vez mais suave.[29], [45]

Através da análise sensorial da cerveja *Índia Pale Ale* (IPA) foi possível determinar a evolução das características organoléticas pretendidas ao longo da realização do processo de *dry-hopping*. Para esta análise o painel de provadores classificou as amostras retiradas durante o processo, identificadas com os códigos presentes na Tabela 15, através de um questionário de provas. As características analisadas foram as seguintes:

- a) Presença de aroma “resinoso”;

- b) Presença de aroma frutado;
- c) Presença de amargor;
- d) Prolongamento do sabor amargo;
- e) Presença de sabor frutado.

Tabela 15 – Identificação das amostras em função do tempo de *dry-hopping*

Código	Duração do <i>dry-hopping</i> (h)
101	10,75
201	6,75
301	4,5
401	2
501	Antes do início do processo

Os resultados dos questionários de prova encontram-se presentes nas Tabelas 16 e 17, correspondendo respetivamente à classificação por parte dos provadores especialistas e dos consumidores regulares.

Tabela 16 – Resultados do questionário de prova realizado por especialistas

Característica	Especialista 1					Especialista 2				
	Código das amostras									
	101	201	301	401	501	101	201	301	401	501
a)	5	4	3	2	1	2	3	4	5	1
b)	4	5	3	2	1	5	3	4	2	1
c)	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
d)	5	4	3	2	1	5	3	4	2	1
e)	4	5	3	2	1	4	2	5	3	1

Relativamente à amostra nº 501, esta foi considerada por ambos os provadores como aquela que apresenta menor presença de todas as características referidas, devido ao facto desta amostra não ter sido submetida ao processo de *dry-hopping*.

Analisando a presença de aroma “resinoso” (característica a), não existe consenso quanto à classificação dos provadores, no que diz respeito às amostras

que sofreram o processo em estudo. Enquanto um dos provadores considera que este aroma está mais presente na amostra com um maior tempo de residência, o segundo provador considera o contrário, é mais intenso na amostra com menor tempo de residência.

Para a presença de aroma frutado (característica b) os provadores consideraram que a amostra com menor tempo de residência (nº 401) é aquela que apresenta esta característica como menos intensa, de todas aquelas que sofreram o processo. Consideraram também, que as amostras com maior tempo de residência são aquelas que possuem maior intensidade, no entanto não se verifica uma relação de linearidade entre os dois fatores.

Na presença de amargor (característica c) ambos os provadores consideraram que a intensidade deste aumenta com o aumento do tempo de residência de *dry-hopping*.

Considerando o prolongamento do sabor amargo (característica d) ambos os provadores classificaram a amostra com menor tempo de residência do processo (nº 401) como aquela que possuía um menor prolongamento, enquanto que a amostra com maior tempo de residência (nº 101) teve a classificação de maior prolongamento, ou seja, verificou-se um aumento do prolongamento do amargor ao longo do processo. Comparando estes resultados com a característica anterior verifica-se que o amargor do produto final é dependente da realização do *dry-hopping*, apesar deste processo ocorrer a baixa temperatura e não existir a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos transferidos do lúpulo fresco para a cerveja. Isto pode ser explicado pela presença de  $\alpha$ -ácidos oxidados, que são bastante solúveis e dessa forma encontram-se presentes na cerveja. Para além disto, os compostos voláteis de aroma podem realçar a perceção da intensidade do amargor, bem como modificar a qualidade deste. A extração de compostos polifenólicos presentes no lúpulo é outro fator que contribui para o aumento da perceção de amargor. [29]

Na presença de sabor frutado (característica e) não existe um consenso na classificação por parte dos provadores, no entanto, ambos consideram que a amostra com maior tempo de residência possui uma classificação intermédia. Sendo esta a principal função do *dry-hopping* verifica-se que não é necessário um

tempo de processo tão prolongado de forma a obter uma intensidade de sabor frutado elevada.

Tabela 17 - Resultados do questionário de prova realizado por consumidores regulares

Característica	Consumidor 1					Consumidor 2					Consumidor 3				
	Código das amostras														
	101	201	301	401	501	101	201	301	401	501	101	201	301	401	501
a)	5	4	2	3	1	5	2	3	4	1	5	2	3	4	1
b)	4	5	2	3	1	1	4	3	2	5	1	3	4	2	5
c)	4	5	3	2	1	3	1	2	4	5	4	2	1	3	5
d)	4	5	3	2	1	4	2	1	3	5	2	1	5	4	3
e)	4	5	3	2	1	1	4	5	3	2	5	3	4	2	1

A classificação por parte dos consumidores regulares de cerveja artesanal foi mais variada quando comparada com a efetuada pelos provedores experientes. Estes classificaram a amostra onde não ocorreu o processo de *dry-hopping* (nº 501) como aquela que possuía a maior intensidade em algumas características.

O maior consenso deste painel passou pela presença do aroma “resinoso”, onde os provadores consideraram que a amostra sem ocorrência do processo (nº 501) e aquela que possui maior tempo de residência (nº 101), possuem menor e maior intensidade desta característica, respetivamente. No entanto, pela classificação, não se nota uma relação direta entre o tempo de residência e a intensidade da característica.

Relativamente à presença de aroma frutado (característica b), a maioria dos consumidores do painel considerou que a amostra sem ocorrência do processo (nº 501) contem uma maior intensidade da característica referida enquanto que a amostra com maior tempo de residência (nº 101) possui a menor intensidade. Estes resultados são contrários aos obtidos pela classificação dos provadores especialistas, e não vão de encontro ao objetivo da realização do *dry-hopping*.

Na presença de amargor (característica c) existe uma discrepância grande entre a classificação dos consumidores, não sendo possível estabelecer

uma ligação entre esta característica e o tempo de residência das amostras. O mesmo acontece para o prolongamento do amargor (característica d), o que não vai de encontro com a classificação dada pelos provadores especialista.

Considerando a presença de sabor frutado (característica e) mais uma vez não é possível encontrar uma relação de linearidade entre o tempo de residência das amostras e a intensidade da característica. No entanto, a maioria dos consumidores regulares classificou as amostras com menos tempo de residência e sem passagem pelo processo como aquelas que possuem uma menor intensidade da referida característica.

Analisando os resultados globais dos questionários realizados a ambos os grupos de provadores verifica-se que a classificação das amostras varia bastante consoante a experiência do painel, sendo que os provadores especialistas conseguiram classificações mais consistentes quando comparadas com as realizadas pelos consumidores regulares.

Sendo o principal objetivo do processo de *dry-hopping* a dissolução de compostos voláteis capazes de conferir aroma e sabor à cerveja final, conclui-se, através das classificações dos provadores, a existência de um tempo de residência excessivo, ou seja, a amostra com maior tempo de residência (nº 101) normalmente apresenta uma classificação intermédia nas características pretendidas para o produto final. Segundo as classificações, não existe uma relação de linearidade entre o tempo de residência e a intensidade das características em avaliação.

Para além disto, verifica-se também um aumento na presença de amargor e no prolongamento do sabor amargo nas amostras retiradas após o início do processo em estudo. Apesar deste ocorrer a baixas temperaturas, o que não provoca a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos dissolvidos, este aumento ocorre devido à existência de  $\alpha$ -ácidos oxidados e pelo facto de os compostos voláteis de aroma poderem realçar a perceção da intensidade do amargor.

## 5. Conclusão

A realização desta dissertação teve como principais objetivos um estudo sobre lúpulo e o método de *dry-hopping*, e a realização de testes à cerveja produzida a partir do método referido de forma a elaborar um plano de melhorias no mesmo.

Durante o decorrer da dissertação recolheram-se amostras de lúpulo utilizado para o *dry-hopping* de uma cerveja do estilo *German Pilsner*, e amostras da própria cerveja antes e depois do processo, para posterior análise da composição volátil. Destas análises, concluiu-se que a abundância dos compostos voláteis de aroma presentes na amostra de lúpulo usado é elevada, sendo possível uma reutilização em posteriores processos de *dry-hopping* do mesmo estilo de cerveja ou adição em fases anteriores do processo cervejeiro. Relativamente às amostras de cerveja, verificou-se a perda de compostos ao longo do processo e apenas o aparecimento de um novo composto. De um modo geral, conclui-se que o processo é ineficiente, que a transferência dos compostos voláteis de aroma é baixa e o número de compostos transferidos é de igual forma bastante reduzida. Isto pode dever-se ao tempo reduzido de duração do processo e a alguma variabilidade do equipamento utilizado. Para esta cerveja, o aumento do tempo do processo de *dry-hopping* poderia resultar no aumento da sua eficiência.

No caso da cerveja IPA as análises aos compostos voláteis de aroma permitem concluir que nas primeiras 4,5 horas do processo de *dry-hopping*, a maioria dos compostos atingem o máximo de abundância. Após este tempo, o seu valor diminui e mantem-se constante sem grandes variações. Na prova sensorial realizada, o painel de provadores considerou que a amostra com maior tempo de residência normalmente apresenta uma classificação intermédia nas características de aroma pretendidas para o produto final. Assim é possível concluir que um tempo de *dry-hopping* de 4,5 horas maximiza a transferência de compostos de aroma. O prolongamento deste processo não se traduz num benefício para as características organoléticas da cerveja, uma vez que aumenta a intensidade de um aroma resinoso, aumenta a presença de amargor e o prolongamento do sabor amargo das amostras.



Sendo a indústria cervejeira uma utilizadora intensiva de água e energia, com uma pegada de carbono significativa devido ao grande desperdício e elevada quantidade de resíduos sólidos e líquidos, uma diminuição do tempo de *dry-hopping* da cerveja IPA levaria a uma redução da utilização de energia e a melhorias das características organolépticas do produto final, enquanto que a reutilização do lúpulo usado pode proporcionar redução de custos. Para além do impacto ambiental, estas mudanças trariam para a empresa melhorias a nível económico.

Para trabalho futuro propõe-se a realização de novas análises à composição volátil da cerveja, variando o tempo e a quantidade de lúpulo utilizado no processo de *dry-hopping*, tendo em vista a otimização destes dois parâmetros. Seria também interessante avaliar a variação dos componentes voláteis de aroma durante o tempo de armazenamento, desde o engarrafamento até à chegada ao consumidor, e a influência que este tempo poderá ter nas características organolépticas conferidas pelo *dry-hopping*.

## Bibliografia

- [1] H. Michael Eßlinger, *Handbook of Brewing*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [2] LOBA, “Sobre nós - Vadia,” 2019. [Online]. Available: <http://www.cervejavadia.pt/pt/sobre-nos/#1>. [Accessed: 20-Jul-2019].
- [3] M. Pavlovic, “Production character of the eu hop industry,” *Bulg. J. Agric. Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 233–239, 2012.
- [4] K. Dodds, *Hops a guide for new growers*, 1st ed. NSW Government - Department of Primary Industries, 2017.
- [5] M. Church, “hop-cross-section - Cannon Hill Brewing,” 2016. [Online]. Available: <https://www.cannonhillbrewing.com.au/hopswest-kracanup-hop-cross-section/>. [Accessed: 07-Oct-2019].
- [6] Research and Markets, “Global Craft Beer Market - Growth, Trends and Forecasts (2018 - 2023),” 2019. [Online]. Available: [https://www.researchandmarkets.com/research/7l94mj/global\\_craft\\_beer?w=5](https://www.researchandmarkets.com/research/7l94mj/global_craft_beer?w=5). [Accessed: 12-Jun-2019].
- [7] Food and Agriculture Organization of the United Nations, “FAOSTAT,” 2019. [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. [Accessed: 12-Jun-2019].
- [8] A. de Sousa, “As duas últimas plantações de lúpulo resistem em Trás-os-Montes,” *TSF*, September 2018.
- [9] J. Barbosa, “Lúpulo tem potencial para abastecer indústria cervejeira nacional,” *VIDA RURAL*, June 2015.
- [10] J. J. Palmer, *How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time*. Ray Daniels, 2006.

- [11] S. Hieronymus, *For the Love of Hops - The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops*. Kristi Switzer, 2012.
- [12] J. Healey, "Hop Varieties - Hopslist," 2018. [Online]. Available: <http://www.hopslist.com/hops/>. [Accessed: 11-Jun-2019].
- [13] J. Healey, "Ella - Hopslist," 2018. [Online]. Available: <http://www.hopslist.com/hops/aroma-hops/ella/>. [Accessed: 13-Jun-2019].
- [14] J. Healey, "Topaz - Hopslist," 2018. [Online]. Available: <http://www.hopslist.com/hops/aroma-hops/topaz/>. [Accessed: 13-Jun-2019].
- [15] J. Healey, "Simcoe® - Hopslist," 2018. [Online]. Available: <http://www.hopslist.com/hops/dual-purpose-hops/simcoe/>. [Accessed: 08-Jul-2019].
- [16] C. W. Bamforth, *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. Elsevier, 2016.
- [17] M. Karabín, T. Hudcová, L. Jelínek, and P. Dostálek, "Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, no. 3, pp. 542–567, May 2016.
- [18] C. Almaguer, C. Schönberger, M. Gastl, E. K. Arendt, and T. Becker, "*Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review," *J. Inst. Brew.*, vol. 120, no. 4, pp. 289–314, September 2014.
- [19] D. De Keukeleire, "Fundamentals of beer and hop chemistry," *Quim. Nova*, vol. 23, no. 1, pp. 108–112, February 2000.
- [20] C. Schönberger and T. Kostelecky, "125<sup>th</sup> anniversary review: The role of hops in brewing," *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 117, no. 3. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 259–267, January 2011.
- [21] T. J. Johnson, C. Halfmann, J. D. Zahler, R. Zhou, and W. R. Gibbons, "Increasing the tolerance of filamentous cyanobacteria to next-generation

- biofuels via directed evolution,” *Algal Res.*, vol. 18, pp. 250–256, September 2016.
- [22] F. A. Pieri *et al.*, “Use of  $\beta$ -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs,” *BMC Vet. Res.*, vol. 12, no. 1, p. 216, December 2016.
- [23] C. Brigham, “Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> using *Ralstonia eutropha* and other ‘Knallgas’ bacteria,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, no. 5, pp. 2113–2120, March 2019.
- [24] T. Kishimoto, A. Wanikawa, K. Kono, and K. Shibata, “Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 23, pp. 8855–8861, 2006.
- [25] C. Martins, T. Brandão, A. Almeida, and S. M. Rocha, “Unveiling the lager beer volatile terpenic compounds,” *Food Res. Int.*, vol. 114, pp. 199–207, December 2018.
- [26] S. Lafontaine and T. H. Shellhammer, “Investigating the Factors Impacting Aroma, Flavor, and Stability in Dry-Hopped Beers,” *Tech. Q.*, vol. 56, pp. 13–23, 2019.
- [27] A. J. King and J. R. Dickinson, “Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 53–62, March 2003.
- [28] D. M. Vollmer and T. H. Shellhammer, “Influence of hop oil content and composition on hop aroma intensity in dry-hopped beer,” *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 74, no. 4, pp. 242–249, September 2016.
- [29] O. Oladokun, S. James, T. Cowley, K. Smart, J. Hort, and D. Cook, “Dry-Hopping: the Effects of Temperature and Hop Variety on the Bittering Profiles and Properties of Resultant Beers,” *BrewingScience*, vol. 70, pp. 187–196, 2017.
- [30] W. Mitter and S. Cocuzza, “Revival of a process (dry hopping-basics and techniques),” *Brew. Beverage Ind. Int.*, no. 3, pp. 28–30.

- [31] T. Podeszwa and J. Harasym, "New methods of hopping (dryhopping) and their impact on sensory properties of beer," *Acta Innov.*, vol. no. 21, no. 21, pp. 81–88, 2016.
- [32] H. Lord and J. Pawliszyn, "Evolution of solid-phase microextraction technology," *Journal of Chromatography A*, vol. 885, no. 1–2. Elsevier, pp. 153–193, July 2000.
- [33] A. L. Pires Valente and F. Augusto, "Microextração por fase sólida," *Quim. Nova*, vol. 23, no. 4, pp. 523–530, August 2000.
- [34] M. C. Chiaradia, C. H. Collins, and I. C. S. F. Jardim, "O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos," *Quimica Nova*, vol. 31, no. 3. Campinas, pp. 623–636, 2008.
- [35] O. D. Sparkman, Z. Penton, and F. G. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, Second. Academic Press, 2011.
- [36] S. M. Rocha, E. Coelho, J. Zrostlíková, I. Delgadillo, and M. A. Coimbra, "Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability," *J. Chromatogr. A*, vol. 1161, no. 1–2, pp. 292–299, August 2007.
- [37] E. Coelho, S. M. Rocha, I. Delgadillo, and M. A. Coimbra, "Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening," in *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 563, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 204–214.
- [38] D. G. Hauser, S. R. Lafontaine, and T. H. Shellhammer, "Extraction Efficiency of Dry-Hopping," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, pp. 1–11, June 2019.
- [39] T. Kishimoto, A. Wanikawa, N. Kagami, and K. Kawatsura, "Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 12, pp. 4701–4707, 2005.

- [40] K. Takoi *et al.*, “Varietal difference of hop-derived flavour compounds in late-hopped/dry-hopped beers,” *BrewingScience*, vol. 69, no. 1–2, pp. 1–7, 2016.
- [41] D. Steyer, C. Leitao, and B. Laugel, “Characterization of the terpenoids composition of beers made with the French hop varieties: Strisselspalt, Aramis, Triskel and Bouclier,” *BrewingScience*, vol. 66, no. 11, pp. 192–197, 2013.
- [42] U.S. National Library of Medicine, “TOXNET - Linalool.” [Online]. Available: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+78-70-6>. [Accessed: 08-Oct-2019].
- [43] U.S. National Library of Medicine, “TOXNET - Myrcene.” [Online]. Available: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+123-35-3>. [Accessed: 08-Oct-2019].
- [44] W. Mitter and S. Cocuzza, “Dry hopping – A study of various parameters,” *Brew. Beverage Ind. Int.*, vol. 4, no. September 2008, pp. 70–74, 2013.
- [45] S. R. Lafontaine and T. H. Shellhammer, “Impact of static dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer,” *J. Inst. Brew.*, vol. 124, no. 4, pp. 434–442, October 2018.