

**Aguardentes vínicas envelhecidas com
diferentes tecnologias.
Estudo da evolução do aroma durante a
conservação em garrafa.**

Cláudia Adriana Fernandes Vitória

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Ilda Maria Justino Caldeira
Co-orientadores: Prof.^a Doutora Ofélia Maria Serralha dos Anjos
Prof.^a Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba

agosto de 2021

Folha em branco

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projeto OXYREBRAND (POCI-01-0145-FEDER-027819) [<https://projects.iniav.pt/oxyrebrand/index.php/pt/>].

Folha em branco

Agradecimentos

Após um ano atípico, mas cheio de novos desafios e de uma vasta aprendizagem, resta-me agradecer a todas as pessoas que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Quero começar por agradecer às minhas orientadoras: Doutora Ilda, Professora Doutora Ofélia e Professora Doutora Eugénia. Foram uma preciosa e incansável ajuda.

Professora Eugénia, muito obrigada pela sua ajuda, disponibilidade e simpatia.

Professora Ofélia, foi a grande impulsionadora para que eu aceitasse este desafio e não podia estar mais grata. A sua grande ajuda e boa disposição foram fundamentais para a concretização deste trabalho!

Engenheira Ilda, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Um obrigado é pouco para agradecer toda a ajuda, dedicação, preocupação e amizade que demonstrou. Adquiri tantos conhecimentos este ano e não seria possível sem si! Muito obrigada!

Quero também deixar um agradecimento a todas as pessoas que trabalham no polo de Dois Portos do INIAV por me terem recebido tão bem. Agradeço ainda à Leandra pela ajuda e pela companhia ao longo da realização desta dissertação.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos, em especial à Beatriz, ao Daniel e à Inês que me apoiaram sempre. Estou muito grata ao Alexandre por todo o apoio, motivação e ajuda que me deu no decorrer deste trabalho.

Por fim, agradeço a toda a minha família por todo o apoio em tudo o que faço. Um agradecimento especial ao meu pai pois sem ele nada seria possível! Quero também deixar um beijinho ao meu irmão pelo apoio e à minha irmã Andreia por toda a ajuda que me deu.

Com receio de esquecer alguém, quero reforçar o agradecimento a todas as pessoas envolvidas na realização deste trabalho!

A todos, muito obrigada!

Folha em branco

Resumo

A aguardente vínica envelhecida é uma bebida com elevado teor alcoólico obtida através da destilação do vinho com posterior envelhecimento em contacto com madeira. Este envelhecimento é tradicionalmente realizado em vasilhas de madeira. Contudo, o uso de vasilhas envolve um processo moroso e dispendioso. Assim, começaram a surgir sistemas de envelhecimento alternativos para colmatar esta necessidade de tornar o processo mais sustentável. O destilado de vinho, a madeira utilizada no envelhecimento e todas interações existentes ao longo do processo de produção da aguardente são a fonte dos compostos voláteis odorantes que tornam a aguardente uma bebida com elevada complexidade aromática.

Este trabalho consistiu em compreender se o uso de diferentes sistemas de envelhecimento (tradicional – vasilha de madeira; ou alternativo – garrações de vidro com aduelas mergulhadas e com diferentes níveis de microxigenação), diferentes madeiras (castanheiro ou carvalho *Limousin*) e/ou tempo de conservação em garrafa têm influência no aroma da aguardente vínica Lourinhã.

A influência no aroma foi avaliada pela análise dos compostos voláteis com recurso a cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia de gases acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) e pela análise sensorial recorrendo a um painel de provadores e realizando uma análise descritiva quantitativa.

Os resultados corroboraram estudos anteriores acerca do uso do sistema alternativo e/ou da madeira de castanheiro serem uma boa opção no envelhecimento de aguardentes e estuda, pela primeira vez, a evolução desta bebida em garrafa, comprovando uma melhoria do aroma durante a conservação em garrafa.

Palavras-chave

Aguardente vínica; Carvalho *Limousin*; Castanheiro; Microxigenação; Conservação em garrafa; Compostos odorantes; Perfil sensorial.

Folha em branco

Abstract

The wine spirit is a drink with high level of alcohol acquired through wine distillation with subsequent aging in contact with wood. This aging is traditionally used in wooden barrels. However, the use of barrels requires a time-consuming and costly process. Therefore, alternative aging systems started to emerge to fill this need to make the process more sustainable. The wine distillate, the wood used in aging and all the interactions that happen throughout the production process of wine spirit are the source of the volatile odorant compounds that make the wine spirit a drink with high aromatic complexity.

This study consists in understanding if the use of different aging systems (traditional – wooden barrels; or alternative – glass demijohns with dipped staves and with different levels of micro-oxygenation), different woods (chestnut or oak) and/or aging times have influence on the aroma of one Lourinhã wine spirit, stored in bottle.

The influence of the aroma was evaluated by the analysis of the volatile compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-FID), and by the sensory analysis using a panel of tasters and performing a quantitative descriptive analysis.

The results confirmed previous studies about the use of the alternative system and/or chestnut wood being a good option in the wine spirit aging and studies, for the first time, the evolution of this bottled drink, proving an improvement in aroma during bottle conservation.

Keywords

Wine spirit; Oak *Limousin*; Chestnut; Micro-oxygenation; Bottle aging; Odorant compounds; Sensorial profile.

Folha em branco

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	vii
Abstract.....	ix
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Capítulo 1 - Introdução	1
1. Aguardente vínica.....	1
2. Uso de madeiras no envelhecimento	7
3. Compostos voláteis (odorantes)	12
4. Análise dos compostos voláteis	19
5. Análise sensorial	21
6. Evolução em garrafa	24
Capítulo 2 - Objetivo.....	25
Capítulo 3 – Procedimento Experimental	26
1. Ensaio e Amostragem.....	26
2. Análise dos compostos voláteis	28
3. Análise Sensorial.....	30
4. Análise estatística	31
Capítulo 4 – Resultados e discussão.....	32
1. Análise dos compostos odorantes	32
2. Análise sensorial	51
3. Análise dos componentes principais (PCA).....	63
Capítulo 5 - Conclusões	67
Bibliografia	69
Anexos.....	78
Anexo I - Ficha de prova de aguardentes	78
Anexo II – Comunicação Oral	79
Anexo III – Resumo para Póster	81
Anexo IV – Artigo Científico.....	83

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1: Regiões com direito a denominação de origem (D.O.) em Portugal (Fonte: IVV).	1
Figura 2: Área geográfica com direito à denominação "Lourinhã" (Fonte: Portaria N°57/2021).	2
Figura 3: Constituintes da coluna de destilação (método contínuo) (Fonte: Mira, 2009).	5
Figura 4: Principais fenómenos e fatores condicionantes do envelhecimento de aguardentes víquicas (Fonte: Canas <i>et al.</i> , 2019a).	6
Figura 5: Operações de tanoaria para a construção das vasilhas (Fonte: Mosedale & Puech, 1998).	9
Figura 6: Esquema de ensaio e identificação de amostras.	27
Figura 7: Cromatograma de um extrato de aguardente envelhecida em vasilha de madeira de castanheiro.	33
Figura 8: Projeção no plano dos compostos voláteis e das amostras de aguardente em relação aos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3).	63
Figura 9: Projeção no plano dos descritores sensoriais em relação aos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3).	65

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos fenólicos e respectivos descritores de aroma e estrutura química..	14
Tabela 2: Isômeros de β -metil- γ -octalactona e respectivos descritores de aroma e estrutura química.....	15
Tabela 3: Aldeídos furânicos/ácido acético e respectivos descritores de aroma e estrutura química.	16
Tabela 4: Ésteres e compostos terpênicos e respectivos descritores de aroma e estrutura química.	17
Tabela 5: Ácidos e Álcoois e respectivos descritores de aroma e estrutura química.	18
Tabela 6: Resultados da ANOVA para os fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e acetovanilona (média e desvio padrão).	35
Tabela 7: Resultados da ANOVA para os isômeros da β -metil- γ -octalactona (média e desvio padrão).	40
Tabela 8: Resultados da ANOVA dos aldeídos furânicos e ácido acético (média e desvio padrão).....	42
Tabela 9: Resultado da ANOVA dos ésteres e compostos terpênicos (média e desvio padrão).....	45
Tabela 10: Resultados da ANOVA dos ácidos e álcoois (média e desvio padrão).	49
Tabela 11: Resultados da ANOVA dos descritores de cor (média e desvio padrão).	52
Tabela 12: Resultados da ANOVA dos descritores de aroma (média e desvio padrão).	54
Tabela 13: Resultados da ANOVA dos descritores de aroma (média e desvio padrão) (continuação).....	55
Tabela 14: Resultados da ANOVA dos descritores de sabor (média e desvio padrão)...	58
Tabela 15: Resultados da ANOVA dos descritores de sabor (média e desvio padrão) (continuação).....	59
Tabela 16: Resultados da ANOVA relativa à apreciação do aroma, do sabor e geral (média e desvio padrão).....	61

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ANOVA	Análise de variância
A.P.	Álcool puro
Ap. Aroma	Apreciação de aroma
Ap. Sabor	Apreciação de sabor
Ap. Geral	Apreciação geral
B	Vasilha
C	Castanheiro
D.O.	Denominação de origem
ex.	Exemplo
Go	Tempo de envelhecimento de 365 dias
G6	Tempo após seis meses em garrafa
GC-FID	Cromatografia de gases acoplada a um detetor de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massa
HMF	5-hidroximetilfurfural
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
IVV	Instituto da vinha e do vinho
L	Carvalho <i>Limousin</i>
LSD	<i>Least significant difference</i> (diferenças mínimas significativas)
n.s.	Não significativo
N.P.	Norma portuguesa
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
Norma ISO	Norma da Organização Internacional da Normalização
OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i> (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
QM+	Queima média mais
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> (microextração em fase sólida)
UE	União Europeia

Folha em branco

Capítulo 1 - Introdução

1. Aguardente vínica

A aguardente vínica é uma bebida espirituosa obtida através da destilação de vinho ou destilados de vinho, com título alcoométrico volúmico mínimo de 37,5%. O teor de substâncias voláteis neste tipo de aguardentes deve ser igual ou superior a 125 g/hL (A.P.) e o teor máximo de metanol é de 200 g/hL (A.P.). Esta não pode ter adição de qualquer álcool nem ser aromatizada, apenas é permitida a adição de caramelo para adaptar a cor e pode ser edulcorada até ao limite de 20 gramas de produtos edulcorantes por litro. Pode ser envelhecida em cascos de carvalho com capacidade inferior a 1000 L ou em recipientes de madeira de carvalho com capacidade de pelo menos 1000 L. Nestes casos, o período de envelhecimento passa a ser de, pelo menos, seis meses e um ano, respetivamente (Regulamento (UE) N° 2019/787).

A aguardente vínica envelhecida faz parte das bebidas alcoólicas mais emblemáticas a nível mundial devido à sua vasta produção, comércio e consumo. A produção desta aguardente, principalmente na Europa, tem uma grande importância socioeconómica. Por exemplo, as regiões francesas de Armagnac e Cognac são locais onde se produzem as aguardentes vínicas de maior prestígio e com maior comercialização. Em Portugal, destaca-se a região da Lourinhã que em 1992 foi delimitada como denominação de origem para aguardentes vínicas envelhecidas, tal como as regiões Armagnac e Cognac (Canas, 2017). Para além da região da Lourinhã, existem mais cinco regiões que produzem aguardentes vínicas envelhecidas com direito a denominação de origem (D.O.): Alentejo, Tejo, Bairrada, Douro e Vinhos Verdes (Fig. 1). No entanto, ao contrário da região da Lourinhã, estas regiões não são de produção exclusiva de aguardentes.



Figura 1: Regiões com direito a denominação de origem (D.O.) em Portugal (Fonte: IVV).

A aguardente utilizada para realizar este trabalho, foi produzida na região da Lourinhã. Para terem denominação de origem “Lourinhã”, toda a produção da aguardente deve ser feita na área da região delimitada (Fig. 2). As aguardentes produzidas em regiões demarcadas devem seguir regulamentos específicos da região, que na maioria dos casos são mais restritivos no que respeita aos aditivos possíveis, normalmente só admitindo o caramelo num teor muito reduzido. No caso da região “Lourinhã” as especificações para a produção da aguardente estão estabelecidas no Decreto-Lei N° 323/1994. Para além das indicações acerca das características dos solos ou das castas a utilizar para este tipo de aguardente, é importante referir que este Decreto-Lei estabelece que o envelhecimento das aguardentes é feito em barris de carvalho com capacidade até 800 L por um período mínimo de dois anos. No entanto, mais recentemente foi publicada a Portaria N°57/2021 referente à região de Lisboa. Neste documento está regulamentada, para além do uso de barris de carvalho, a permissão do uso de barris de castanheiro com capacidade até 800 L para o envelhecimento de aguardentes Lourinhã.



Distrito	Concelho	Freguesias
Leiria	Bombarral	Da União das Freguesias do Bombarral e Vale Covo a freguesia de Vale Covo.
	Óbidos	Olho Marinho
	Peniche	Atouguia da Baleia
Lisboa	Lourinhã	Serra d'El-Rei
		Moita dos Ferreiros
		Reguengo Grande
		Ribamar
		Santa Bárbara
		União das Freguesias de Lourinhã e Atalaia
		União das Freguesias de Miragaia e Marteleira
		União das Freguesias de São Bartolomeu dos Galegos e Moledo
		Vimeiro
		Torres Vedras
	União das Freguesias de Campelos e Outeiro da Cabeça	

Figura 2: Área geográfica com direito à denominação "Lourinhã" (Fonte: Portaria N°57/2021).

1.1. Qualidade da aguardente vínica

Existem diversos fatores que influenciam a qualidade das aguardentes designadamente a matéria-prima, o processo de fermentação, a destilação e o envelhecimento (Belchior *et al.*, 2015; Tsakiris *et al.*, 2014).

Matéria-prima e processo de fermentação

Como já foi referido, a aguardente vínica é uma bebida alcoólica obtida a partir da destilação do vinho. Como tal, a matéria-prima está relacionada com a qualidade da uva utilizada para produzir o vinho que dará origem à aguardente. As uvas utilizadas devem ter baixo teor em açúcares e elevada acidez podendo ser de castas de alto rendimento e não devem possuir aromas muito intensos (Belchior *et al.*, 2015). O vinho utilizado para obter aguardente deve ser isento de oxidações, não deve ser adicionado dióxido de enxofre e a sua acidez fixa deve ser elevada. Com a acidez fixa elevada, o vinho estará protegido de contaminações microbianas até ser destilado, evitando o uso de dióxido de enxofre durante a vinificação, o qual iria salientar-se na aguardente ou originar a presença de mercaptanos sendo que ambos conferem aromas desagradáveis à aguardente (Belchior *et al.*, 2015; Léauté, 1990; Ledauphin *et al.*, 2006). Assim, para produzir um bom vinho para destilar é necessário ter especial atenção a alguns fatores determinantes como: a localização das vinhas, a época de vindima e a escolha das castas (Léauté, 1990). As aguardentes produzidas em Portugal advêm de vinhos de castas de uva branca ou tinta, recomendadas/autorizadas em cada região.

O processo de fermentação é a transformação das uvas em vinho, por ação das leveduras. Deste processo resulta o etanol e diversos compostos que podem ser desejáveis ou indesejáveis para o sabor do destilado, sendo que os indesejáveis deverão ser removidos ao longo do processo de destilação (Berk, 2009; Faúndez *et al.*, 2006).

O período entre a fermentação e a destilação pode durar até cinco meses, podendo ocorrer várias reações químicas que resultam na alteração da composição do vinho. Este período deve ser o mais curto possível para evitar o aumento de acetato de etilo, lactato de etilo, succinato de dietilo, acetaldeído ou ácido acético e a diminuição do teor de ésteres com propriedades aromáticas de interesse (ex.: acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de 2-feniletilo, etc.), sendo que a destilação pode ser feita logo após o fim da fermentação (Coldea *et al.*, 2017; Tsakiris *et al.*, 2014).

Destilação

A destilação é um dos mais antigos processos de separação e a sua principal aplicação no setor alimentar é a produção de etanol e bebidas alcoólicas. Esta operação consiste na separação líquido-vapor de substâncias baseada nas diferenças de volatilidade, sendo o calor o agente de separação (Berk, 2009; Faúndez *et al.*, 2006). Quando uma mistura com substâncias de diferentes volatilidades entra em ebulição, a composição do líquido de ebulição difere da composição dos vapores libertados. Os vapores, após a sua condensação, irão constituir o destilado e o restante líquido constituirá os resíduos ou rescaldos (Berk, 2009).

A destilação é um fator muito influente na qualidade do destilado, contribuindo para um aumento significativo de compostos aromáticos responsáveis pelo sabor da aguardente (Tsakiris *et al.*, 2014). Pode ser feita através de dois métodos: o método descontínuo e o método contínuo.

No método descontínuo, é utilizado um alambique e efetua-se uma dupla destilação para aumentar o teor alcoólico e melhorar a qualidade da aguardente. Durante a destilação deve se fazer a separação de três frações distintas: cabeças, corações e caudas. É crucial que a separação destas três frações seja realizada corretamente para não prejudicar a qualidade da aguardente (Belchior *et al.*, 2015). A parte final, normalmente designada por caudas, apresenta aromas desagradáveis (Faisca, 2012).

No método contínuo, são utilizadas colunas de destilação e a destilação é uniforme, sem separação das frações (cabeça, coração e cauda) (Belchior *et al.*, 2015). O destilado obtido através deste método contém apenas uma pequena quantidade de substâncias voláteis e consequentemente, as aguardentes produzidas através deste método são menos aromáticas (Tsakiris *et al.*, 2014).

Destilação em coluna

A aguardente vínica utilizada para realizar este trabalho foi obtida através do método contínuo. O uso deste método permite efetuar apenas uma destilação e em funcionamento contínuo. Garreau (2008), considera este método de destilação economicamente mais vantajoso quando comparado ao método descontínuo. Tal facto baseia-se na capacidade do método contínuo em destilar grandes volumes de vinho em menos tempo, apesar de, como anteriormente mencionado, apresentarem menor riqueza

aromática. A destilação em coluna também apresenta uma função de retificação muito superior à destilação em alambiques e permite que o vinho seja introduzido continuamente e a saída de aguardente seja constante (Garreau, 2008).

Este sistema é composto por uma coluna com um conjunto de pratos sobrepostos no seu interior, onde os compostos voláteis do vinho são separados. Os principais constituintes deste sistema são a caldeira, a coluna, o aquece-vinhos e o sistema de refrigeração (condensador e serpentina) (Fig. 3) (Garreau, 2008).

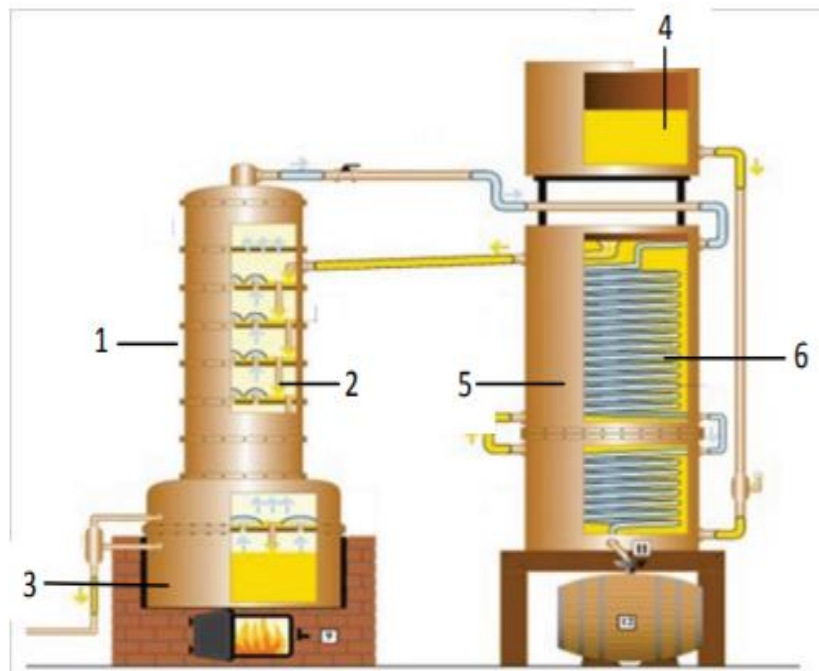


Figura 3: Constituintes da coluna de destilação (método contínuo) (Fonte: Mira, 2009).
1-Coluna; 2-Pratos da coluna; 3- Caldeira; 4- Aquece-vinhos; 5-Condensador; 6-Serpentina

Para iniciar a destilação, coloca-se o vinho no aquece-vinhos (4). Aqui, o vinho pode atingir temperaturas elevadas (85 °C) e de seguida, desloca-se até à coluna (1), entrando pela parte superior e percorrendo os pratos (2) até chegar à base. Na base existe um depósito onde se acumula o rescaldo (fração de bebida não destilada). Simultaneamente, a caldeira (3) produz uma corrente de vapor quente que entra pela parte inferior da coluna, fazendo o vinho entrar em ebulição. A ebulição liberta vapor que sobe pela coluna, atravessando os pratos da coluna e entrando em contacto com o vinho que se desloca pela coluna. Assim, na coluna de destilação, a parte líquida segue um percurso descendente enquanto o vapor ascende e é conduzido para o condensador (5). No condensador, como o nome indica, ocorre a condensação do vapor e a libertação da aguardente (Garreau, 2008). O processo termina e toda a aguardente é recolhida quando o sistema atinge o equilíbrio.

Envelhecimento

Após a destilação, as aguardentes víquicas são tradicionalmente armazenadas em vasilhas de madeira durante um período mais ou menos prolongado. Este processo denomina-se de envelhecimento ou maturação. É o período onde ocorrem diversas e importantes alterações químicas, físicas e sensoriais nas aguardentes (Belchior *et al.*, 2001, 2003; Bertrand, 2003; Caldeira *et al.*, 2006; Canas *et al.*, 1999, 2002, 2013; Léauté *et al.*, 1998; Lurton *et al.*, 2012; Mosedale & Puech, 1998; Nishimura *et al.*, 1983; Patricio *et al.*, 2005), aumentando a qualidade das mesmas. Estas alterações dão-se através da difusão lenta e contínua do oxigénio por entre a madeira (Canas *et al.*, 2009) e pela libertação dos compostos extraíveis da madeira para a aguardente (Belchior *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 2002, 2013) (Fig. 4). Em consequência dessas transformações as características organoléticas das aguardentes modificam-se consideravelmente (Belchior *et al.*, 2001; Caldeira, 2004; De Aquino *et al.*, 2006).

Assim, para além da composição do destilado, as características da vasilha (tipo de madeira utilizado, tratamento térmico, tamanho da vasilha), o tempo de envelhecimento, as operações tecnológicas e as condições da adega/cave são exemplos de fatores condicionantes do envelhecimento (Fig. 4) (Caldeira *et al.*, 2010, 2016; Canas *et al.*, 2011, 2016, 2019a).

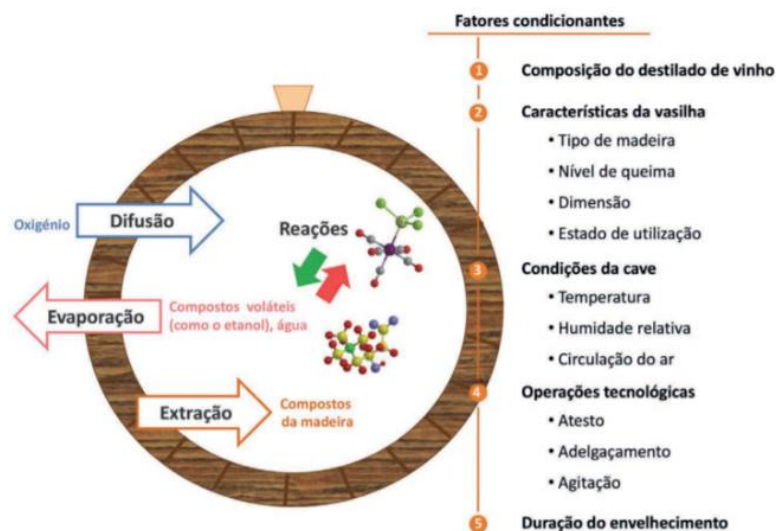


Figura 4: Principais fenômenos e fatores condicionantes do envelhecimento de aguardentes víquicas (Fonte: Canas *et al.*, 2019a).

2. Uso de madeiras no envelhecimento

2.1. Madeiras

A madeira utilizada para o envelhecimento de bebidas alcoólicas é essencial para definir as características sensoriais e a qualidade das mesmas (Caldeira, 2004; Canas *et al.*, 2018). As alterações físico-químicas que ocorrem no envelhecimento em madeira resultam em correspondentes modificações no perfil sensorial, designadamente na cor, aroma e sabor do produto (Caldeira *et al.*, 2006).

A madeira contém na sua composição química, compostos de massa molecular elevada (celulose, hemicelulose, lenhina) e compostos de massa molecular baixa (compostos orgânicos e inorgânicos) (Fengel & Wegener, 1989). Os compostos orgânicos de baixo peso molecular são extraíveis da madeira (Fengel & Wegener, 1989) e têm um papel fundamental nas propriedades sensoriais da aguardente vínica envelhecida como a cor, o sabor e o aroma (Canas *et al.*, 2011, 2013; 2019a). Os estudos do processo de envelhecimento têm vindo a demonstrar que os compostos de madeira enriquecem significativamente a aguardente.

A madeira de carvalho foi considerada por alguns autores (Cutzach *et al.*, 1997; Puech *et al.*, 1990; Viriot *et al.*, 1993) como a que origina vinhos e aguardentes de melhor qualidade. No entanto, vários trabalhos têm demonstrado que a madeira de castanheiro apresenta grandes potencialidades para o envelhecimento de aguardentes (Caldeira *et al.*, 2010; Canas *et al.*, 2011, 2016, 2018). Em resultado do conhecimento obtido sobre a madeira de castanheiro (Canas *et al.*, 2018) e como já foi referido anteriormente, no ano de 2021 foi publicada a Portaria 57/2021, autorizando o uso de madeira de castanheiro no envelhecimento de aguardentes “Lourinhã”.

Madeira de carvalho

A madeira das espécies de carvalho francês (*Quercus robur* L. e *Quercus sessiliflora* Salisb) e carvalho americano (*Quercus alba* L.) têm sido estudadas nas últimas décadas quanto ao seu potencial de utilização para envelhecimento de aguardentes. Os estudos feitos a estas espécies têm-se baseado, principalmente, na avaliação da sua composição química (Anjos *et al.*, 2013) e das suas propriedades físicas e mecânicas (Canas *et al.*, 2011).

A madeira mais utilizada no envelhecimento de aguardentes é a madeira de carvalho da região francesa *Limousin* (Canas *et al.*, 2011, 2016; Léauté *et al.*, 1998; Mosedale & Puech, 1998). Segundo alguns autores (Caldeira, 2004; Keller, 1987), o carvalho tem interesse como madeira para a tanoaria devido às suas características de resistência, fissibilidade, flexibilidade, estanquicidade e durabilidade. Também a impermeabilidade aos líquidos e a ligeira permeabilidade aos gases são propriedades físicas importantes que se devem ter em conta pois promovem a oxigenação da aguardente durante o envelhecimento.

A madeira de carvalho é quimicamente rica em compostos orgânicos extraíveis. Este facto torna o uso deste tipo de madeira no envelhecimento de aguardentes interessante pois irá permitir originar aguardentes envelhecidas com ótimas características organoléticas (Anjos *et al.*, 2013).

Madeira de castanheiro

Desde o século XVIII que a madeira de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) é utilizada para fabricar vasilhas de armazenamento e transporte de vinhos europeus, como o vinho do Porto (Canas *et al.*, 2011).

Este tipo de madeira tem sido muito utilizado nos países mediterrânicos devido à sua importância histórica, económica e social (Canas *et al.*, 2011), e tem vindo a ser investigada como uma possibilidade vantajosa no envelhecimento de bebidas alcoólicas (Canas *et al.*, 2018). No ano de 2005, a madeira de castanheiro foi reconhecida como apta para a produção de vasilhas, mas apenas destinadas ao envelhecimento de vinhos (Résolution OENO 4/2005).

Vários estudos em vinhos (Alañón *et al.*, 2012, 2013; Cabrita *et al.*, 2011; De Rosso *et al.*, 2009; Eiriz *et al.*, 2007; Fernández de Simón *et al.*, 2014; Gambuti *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2012) e aguardentes (Belchior *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2010; Canas *et al.*, 1999, 2002, 2008) têm sido efetuados para verificar o interesse deste tipo de madeira no envelhecimento de bebidas.

Comparando com a madeira de carvalho, a madeira de castanheiro enriquece a aguardente através da composição química do destilado e das características sensoriais, aumentando a complexidade e a qualidade do produto e, portanto, a madeira de castanheiro tem demonstrado ser uma alternativa mais sustentável para o

envelhecimento de aguardentes vnicas (Canas *et al.*, 2018), visto que, para além das características já mencionadas, este tipo de madeira é mais barato e permite um envelhecimento menos demorado (Belchior *et al.*, 2001; Caldeira, 2004; Canas *et al.*, 1999, 2011, 2016). Para além disso a madeira de castanheiro também apresenta maior porosidade (De Rosso *et al.*, 2009) e maiores perdas de aguardente durante o envelhecimento (Belchior *et al.*, 2001).

Os autores Belchior & Mateus (2005) observaram que, em comparação com a madeira de carvalho, o envelhecimento de três anos de aguardentes em madeira de castanheiro contribuiu para aguardentes com maiores e mais rápidas extraoes de compostos extraíveis da madeira. Outro estudo realizado por Canas *et al.* (2011), demonstrou que a madeira de castanheiro apresenta elevados teores de compostos fenólicos e derivados furânicos e baixos teores de alguns compostos voláteis.

Assim, este tipo de madeira apresenta um elevado interesse para a tanoaria. A sua utilização no envelhecimento de vinhos e aguardentes proporciona um aumento nos teores de compostos fenólicos, taninos e compostos odorantes-chave de baixo peso molecular como, por exemplo: vanilina, eugenol e 4-metilsiringol (Canas *et al.*, 2011).

2.2. Tecnologia de tanoaria

Para construir as vasilhas, a madeira é submetida a diversas operaoes (Mosedale, 1995; Mosedale & Puech, 1998) conforme ilustrado na Fig. 5: seleção/abate das árvores, corte e fendimento, secagem/maturação da madeira, fabrico da vasilha (preparação de aduelas; montagem, bastião/vergadura; queima da vasilha; acabamentos finais).

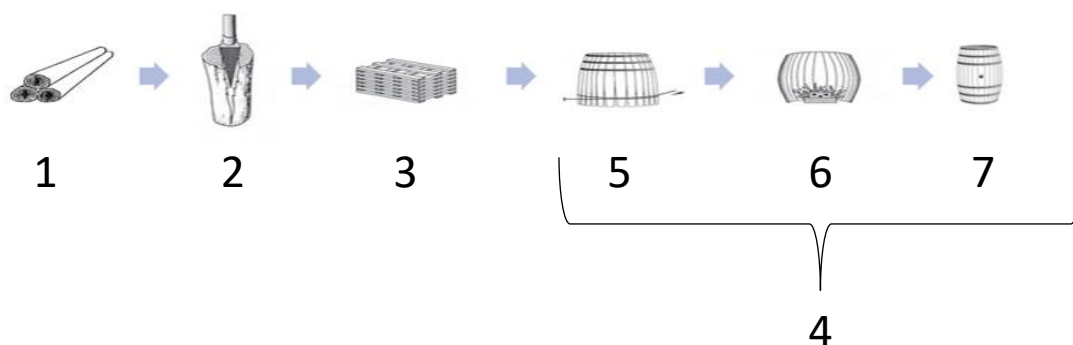


Figura 5: Operaoes de tanoaria para a construção das vasilhas (Fonte: Mosedale & Puech, 1998).
1-Seleção/abate; 2-Corte/fendimento; 3- Secagem; 4- Fabrico (5-Vergadura; 6-Queima; 7-Acabamento)

As características das árvores e as operações de tanoaria geram alterações físico-químicas importantes na madeira. Assim, cada vasilha fabricada tem sempre uma composição diferente, facto que deve ser controlado. É importante ter em conta que a tecnologia de tanoaria produz vasilhas de diferente composição que se irá refletir na qualidade sensorial das aguardentes durante o envelhecimento (Léauté *et al.*, 1998).

Assim, as operações de tanoaria têm influência na composição da madeira, sendo que há muitos anos se sabe que a queima é um fator muito influente, causando modificações na libertação de compostos voláteis (Cabrita *et al.*, 2012; Doerr *et al.*, 1966; Fiddler *et al.*, 1966, 1970). A fase de secagem é, também, uma etapa importante para a formação de compostos voláteis (Cabrita *et al.*, 2012).

Sendo a queima da madeira um fator muito influente, conseqüentemente o nível de queima tem também muita importância. Os níveis de queima são normalmente divididos em queima leve, média ou forte. Nas aguardentes, aumentar o nível de intensidade de queima traduz-se em acréscimos dos teores dos compostos voláteis extraíveis da madeira. Também as características sensoriais sofrem alterações influenciadas pelo nível de queima das vasilhas (Belchior *et al.*, 2001; Caldeira, 2004).

Para a realização deste trabalho, as madeiras das vasilhas e das aduelas utilizadas foram submetidas a um nível de queima média.

2.3. Sistema de envelhecimento alternativo

O envelhecimento tradicional em vasilhas de madeira é uma técnica demorada e dispendiosa. Por este motivo, novas técnicas têm sido desenvolvidas de modo a otimizar o processo e reduzir os seus custos. Uma das técnicas que tem vindo a ser investigada é a introdução de pedaços de madeira (aduelas, aparas, dominós) na bebida que se pretende envelhecer durante o seu armazenamento em depósitos, algo já muito estudado em vinhos mas menos estudado em aguardentes (Caldeira *et al.*, 2009, 2013).

O bom resultado desta técnica em vinhos permitiu à OIV aprovar, em 2005, a adição de aparas e aduelas de carvalho ao vinho, em alternativa ao envelhecimento tradicional em vasilha (Résolution OENO 3/2005).

São conhecidos estudos de sistemas alternativos de envelhecimento em aguardentes de cidra (Rodriguez Madrera *et al.*, 2013), de maçã (Coldea *et al.*, 2020), de bagaço de uva

(Rodríguez-Solana *et al.*, 2017; Taloumi & Makris, 2017) e de cana-de-açúcar (Bortoletto & Alcarde, 2015; Quesada Granados *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que o uso deste tipo de tecnologia em vinhos, cidra e vinagre tem um efeito positivo, permitindo que o tempo de envelhecimento seja mais reduzido e de melhor qualidade. No que diz respeito às aguardentes vínicas, têm sido efetuados vários estudos (Caldeira *et al.*, 2013; Canas *et al.*, 2009; Granja-Soares *et al.*, 2020) para determinar o efeito deste tipo de sistema.

Microoxigenação

O oxigénio é indispensável nos mecanismos químicos que ocorrem ao longo do envelhecimento, envolvendo compostos fenólicos e derivados furânicos que são sensorialmente importantes (Canas *et al.*, 2016). Os resultados obtidos por Canas *et al.* (2016), permitiram concluir que a diferenciação química das aguardentes envelhecidas é influenciada pelo nível de oxigénio presente durante o processo de envelhecimento.

No envelhecimento tradicional, a oxidação, nas vasilhas de madeira, dá-se através da difusão lenta e contínua do oxigénio pelo espaço entre aduelas e pela madeira (Canas *et al.*, 2011; 2019b). Assim, nos trabalhos mais recentes (Canas *et al.*, 2019b; Granja-Soares *et al.*, 2020) estudou-se a utilização da aplicação de fragmentos de madeira com aplicação simultânea de microoxigenação, ou seja, a adição de oxigénio em pequenas doses, de forma a simular a difusão que ocorre na utilização de vasilhas (Gómez-Plaza & Cano-López, 2011; Parish *et al.*, 2005). Desta forma, é garantido um processo mais rápido e económico (Canas *et al.*, 2019b). Os resultados obtidos mostraram que o sistema alternativo com aplicação de microoxigenação permitiu acelerar o processo de envelhecimento, verificando-se uma extração mais acelerada de alguns compostos e as aguardentes correspondentes apresentaram características sensoriais de maior evolução (Canas *et al.*, 2020; 2019b; Granja-Soares *et al.*, 2020).

3. Compostos voláteis (odorantes)

O aroma é uma propriedade organolética que resulta da percepção de estímulos, provocados por substâncias voláteis, pelo sentido do olfato (Norma ISO 5492:2008).

Apesar da identificação de largas centenas de compostos voláteis em vários alimentos e também em bebidas alcoólicas, apenas uma reduzida percentagem tem efetivamente influência no aroma, os quais se designam por odorantes ou odorantes-chave (Grosch, 2001; Ilc *et al.*, 2016).

O aroma é um atributo com muita influência na qualidade sensorial e na aceitabilidade da bebida. Por este motivo, é importante identificar e quantificar os compostos odorantes existentes na aguardente (análise química) e ainda avaliar a sua percepção na análise sensorial (Caldeira, 2004; Granja-Soares *et al.*, 2020). Os estudos na área do aroma consistem precisamente em correlacionar estas duas análises recorrendo a métodos de análise estatística. Esta correlação entre a análise dos compostos voláteis (química) e a análise sensorial das aguardentes víquicas já foi demonstrada em alguns estudos (Caldeira *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2004; Janáčová *et al.*, 2008; Lablanquie *et al.*, 2002).

A aguardente víquica é constituída, principalmente, por água, etanol e diversos compostos voláteis (Awad *et al.*, 2017; Bertrand, 2003; Caldeira *et al.*, 2010).

Os principais compostos odorantes das aguardentes víquicas, envelhecidas em vasilhas de madeira, incluem compostos extraídos da madeira (β -metil- γ -octalactona, aldeídos furânicos, aldeídos fenólicos e fenóis voláteis) e compostos provenientes do destilado (ácidos, álcoois, ésteres e terpenos) (Caldeira *et al.*, 2016; Granja-Soares *et al.*, 2020). Alguns compostos estão já presentes nas uvas e nos vinhos (Caldeira *et al.*, 2002) e outros podem sofrer alterações nos seus teores devido à existência de evaporações ou de reações de oxidação, esterificação e acetalização.

Normalmente, os teores dos compostos provenientes da madeira aumentam com o tempo de envelhecimento (Caldeira *et al.*, 2016; Canas *et al.*, 2013; Puech *et al.*, 1984) e os teores da maioria dos compostos provenientes do destilado não parecem sofrer alterações durante o tempo de envelhecimento (Caldeira *et al.*, 2016; Puech *et al.*, 1984), com exceção dos que participam em reações de oxidação e esterificação que aumentam o seu conteúdo ao longo do envelhecimento como é o caso do acetaldeído, ácido acético e acetato de etilo (Puech *et al.*, 1984; Reazin, 1983).

3.1. Compostos extraídos da madeira

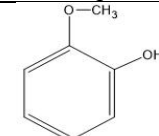
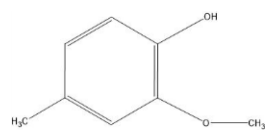
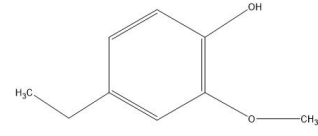
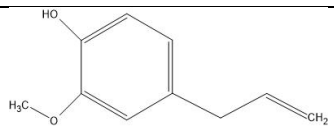
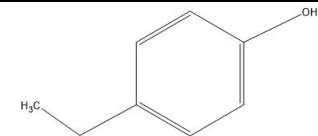
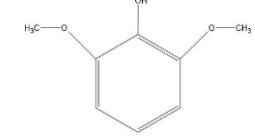
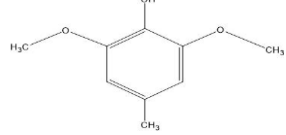
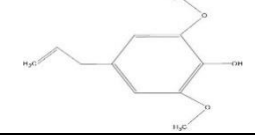
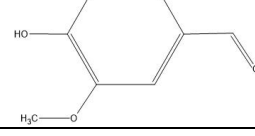
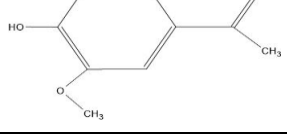
Fenóis (fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e fenilcetonas)

Os fenóis voláteis (Tabela 1) resultam da termodegradação das lenhinas da madeira (Fengel & Wegener, 1989), podendo as aguardentes jovens (sem envelhecimento) apresentar alguns fenóis voláteis provenientes do vinho. No entanto, os aumentos dos teores desta família de compostos, durante o envelhecimento da aguardente, devem-se ao contacto com a madeira (Caldeira, 2004).

Os aldeídos fenólicos (Tabela 1) resultam da degradação das lenhinas da madeira (Puech *et al.*, 1989). O composto com maior importância para o aroma é a vanilina. As aguardentes jovens não apresentam aldeídos fenólicos mas estes encontram-se presentes nas aguardentes envelhecidas (Caldeira, 2004). Assim, conclui-se que o aumento de aldeídos fenólicos se deve à sua presença na madeira que entra em contacto com a aguardente no processo de envelhecimento.

As fenilcetonas (Tabela 1) são libertadas durante o aquecimento da madeira (Chatonnet *et al.*, 1989), estando presentes nas aguardentes envelhecidas devido ao contacto da aguardente com a madeira durante o envelhecimento.

Tabela 1: Compostos fenólicos e respectivos descritores de aroma e estrutura química.

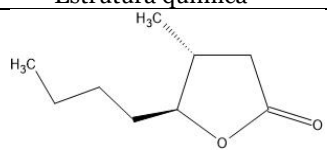
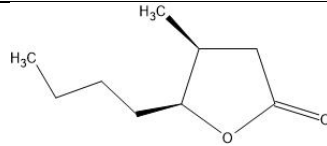
	Nome do composto	Nome IUPAC*	Descritor do aroma	Estrutura química**
Fenóis Voláteis	guaiacol	2-metoxifenol	Farmácia; Pomada; Fumo ⁽¹⁾	
	4-metilguaiacol	4-metil-2-metoxifenol	Fumo; Cinzas ⁽²⁾	
	4-etilguaiacol	4-etil-2-metoxifenol	Cravos; Floral ⁽¹⁾	
	eugenol	2-metoxi-4-(2-propenil)fenol	Cravo da Índia ⁽³⁾	
	4-etilfenol	4-etilfenol	Cavalo; Estrebaria ⁽¹⁾	
	siringol	2,6-dimetoxifenol	Queimado; Fumo; Madeira queimada ^{(1) (3)}	
	4-metilsiringol	4-metil-2,6-dimetoxifenol	Fumo; Queimado; Floral ⁽¹⁾	
	4-alilsiringol	4-alil-2,6-dimetoxifenol	Floral; Cravo; Fumo; Queimado ⁽³⁾	
Aldeído fenólico	vanilina	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído	Baunilha ⁽³⁾	
Fenilcetona	acetovanilona	1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)etanona	Baunilha ⁽¹⁾	

*(Cabrita *et al.*, 2012) **Todas as estruturas químicas foram feitas através do programa *ChemSketch*.
(1):(Caldeira, 2004); (2):(Caldeira *et al.*, 1999); (3):(Caldeira *et al.*, 2008).

Isômeros de β -metil- γ -octalactona

O composto β -metil- γ -octalactona deriva de lípidos e caracteriza-se por ser um composto presente na madeira de carvalho, mas ausente ou em teores vestigiais na madeira de castanheiro. Este composto já foi identificado em madeira de carvalho na forma de dois isômeros diferentes (*cis* e *trans*) (Tabela 2), sendo predominante o isômero *cis*. No envelhecimento da aguardente, verifica-se um aumento dos teores deste composto com o tempo de envelhecimento (Otsuka *et al.*, 1974).

Tabela 2: Isômeros de β -metil- γ -octalactona e respectivos descritores de aroma e estrutura química.

	Nome do composto	Nome IUPAC*	Descritor do aroma	Estrutura química**
β -metil- γ -octalactona	<i>trans</i>-β-metil-γ-octalactona	<i>trans</i> -4-metil-5-butildihidro-2(3 <i>H</i>)-furanona	Doce; Floral (3)	
	<i>cis</i>-β-metil-γ-octalactona	<i>cis</i> -4-metil-5-butildihidro-2(3 <i>H</i>)-furanona	Cocô; Doce (3)	

*(Cabrita *et al.*, 2012) **Todas as estruturas químicas foram feitas através do programa *ChemSketch*. (3):(Caldeira *et al.*, 2008).

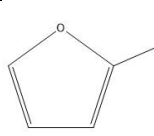
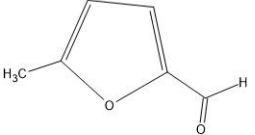

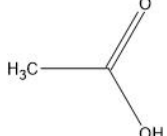
Aldeídos furânicos e ácido acético

Os aldeídos furânicos (Tabela 3) são as principais substâncias derivadas dos polissacáridos (celuloses e hemiceluloses) e resultam fundamentalmente da termodegradação dos açúcares. Assim, o 5-hidroximetilfurfural e o 5-metilfurfural resultam das hexoses da celulose e o furfural resulta das pentoses da hemicelulose (Cabrita *et al.*, 2012; Le Floch *et al.*, 2015). No que diz respeito à aguardente jovem, já foram identificados os compostos furfural e 5-metilfurfural (Caldeira, 2004). Estes compostos tiveram origem na degradação térmica dos açúcares residuais do vinho. Durante o envelhecimento, a aguardente apresenta um aumento nos teores destes compostos, confirmando a influência da extração da madeira. Destes três aldeídos furânicos, o furfural é o mais abundante.

O ácido acético (Tabela 3) é um produto secundário da degradação térmica da madeira (Bourgois & Guyonnet, 1988; Fengel & Wegener, 1989) e resulta da hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses. Nas aguardentes jovens, já existe ácido acético (Caldeira,

2004) e o seu teor aumenta ao longo do envelhecimento devido à oxidação do acetaldeído (Reazin *et al.*, 1976). No entanto, o aumento normalmente é superior ao que se deveria obter pela reação de oxidação. Assim, a extração de ácido acético da madeira contribui também para esse aumento (Nishimura *et al.*, 1983; Reazin *et al.*, 1976).

Tabela 3: Aldeídos furânicos/ácido acético e respectivos descritores de aroma e estrutura química.

	Nome do composto	Nome IUPAC*	Descritor do aroma	Estrutura química**
Aldeídos furânicos	furfural	2-furanocarboxaldeído	Pão fresco; Frutos Secos ⁽¹⁾ (4)	
	5-metilfurfural	5-metil-2-furanocarboxaldeído	Tabaco; Baunilha ⁽¹⁾ (4)	
	5-hidroxiacetilfurfural	5-hidroxiacetil-2-furanocarboxaldeído	Caramelo ⁽⁴⁾	
Ácido	ácido acético	ácido etanóico	Vinagre ⁽¹⁾	

*(Cabrita *et al.*, 2012) **Todas as estruturas químicas foram feitas através do programa *ChemSketch*.
(1):(Caldeira, 2004); (4):(Janáčková *et al.*, 2008).

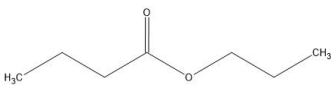
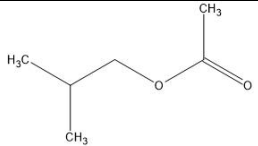
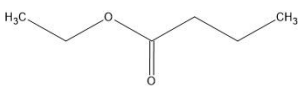
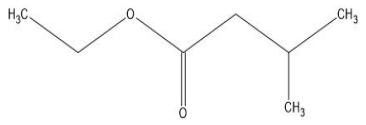
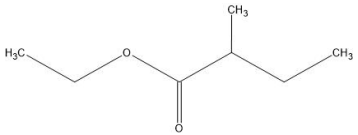
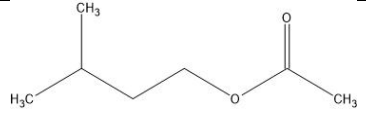
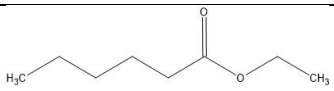
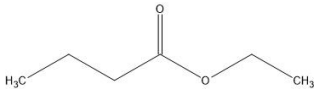
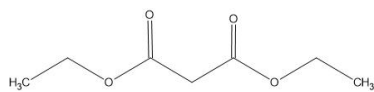
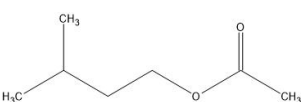
3.2. Compostos provenientes do destilado

Ésteres e compostos terpênicos

Os ésteres (Tabela 4) são compostos que se formam durante a fermentação das uvas, resultando do metabolismo das leveduras. São compostos que já existem no destilado (Bertrand *et al.*, 1978) mas as suas quantidades podem variar durante o envelhecimento (Canas *et al.*, 2011).

Os compostos terpênicos (Tabela 4) são compostos presentes nas uvas e que, portanto, estão presentes nas aguardentes jovens (Léauté, 1990). Tal como acontece com os ésteres, as quantidades destes compostos podem variar ao longo do processo de envelhecimento (Canas *et al.*, 2011).

Tabela 4: Ésteres e compostos terpênicos e respectivos descritores de aroma e estrutura química.

	Nome do composto	Nome IUPAC*	Descritor do aroma	Estrutura química**
Ésteres	isobutirato de etilo	2-metilpropanoato de etilo	Frutado; Floral; Adocicado ⁽¹⁾	
	acetato de isobutilo	etanoato de 2-metilprop-1-ilo	Ervas frescas ⁽¹⁾	
	butirato de etilo	butanoato de etilo	Herbáceo; Frutado ⁽¹⁾	
	2-metilbutanoato de etilo	2-metilbutanoato de etilo	Frutado; Floral; Maçã ⁽¹⁾	
	isovalerato de etilo	3-metilbutanoato de etilo	Frutado; Floral ⁽¹⁾	
	acetato de isoamilo	etanoato de 3-metilbut-1-ilo	Frutado; Banana ⁽¹⁾	
	hexanoato de etilo	hexanoato de etilo	Frutado; Floral ⁽¹⁾	
	octanoato de etilo	octanoato de etilo	Floral; Frutado ⁽³⁾	
	malato de dietilo	malato de dietilo	Adocicado, Algodão Doce; Queimado ⁽¹⁾	
Composto Terpênico	linalol	3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol	Floral; Violetas ⁽³⁾	

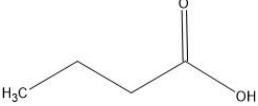
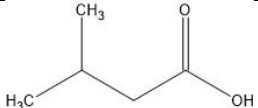
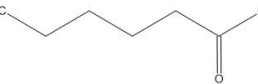

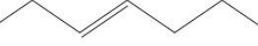
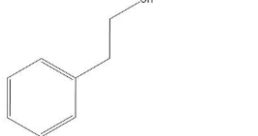
*(Granja-Soares, 2019) **Todas as estruturas químicas foram feitas através do programa *ChemSketch*.
 (1):(Caldeira, 2004); (3):(Caldeira *et al.*, 2008).

Ácidos e Álcoois

Os ácidos (Tabela 5) são compostos já existentes nas aguardentes jovens cujos teores, durante o envelhecimento, podem sofrer acréscimos (Canas *et al.*, 2011) visto que, alguns foram já identificados em madeiras.

Para além do etanol, já foram identificados outros álcoois presentes nas aguardentes. Estes álcoois são normalmente apelidados de álcoois superiores devido a apresentarem mais de dois átomos de carbono (Bertrand *et al.*, 1978). Apesar dos diversos álcoois existentes, neste estudo apenas foram investigados dois álcoois: *trans*-2-hexenol e 2-feniletanol (Tabela 5). São álcoois provenientes do vinho e, portanto, já se encontram nas aguardentes jovens (Caldeira, 2004). No entanto, as suas quantidades no destilado podem variar ao longo do período de envelhecimento (Canas *et al.*, 2011). O álcool *trans*-2-hexenol é normalmente formado antes da fermentação e o álcool 2-feniletanol resulta do metabolismo das leveduras.

Tabela 5: Ácidos e Álcoois e respetivos descritores de aroma e estrutura química.

	Nome do composto	Nome IUPAC*	Descritor do aroma	Estrutura química**
Ácidos	ácido butanóico	ácido butanóico	Manteiga; Queijo ⁽¹⁾	
	ácido isovalérico	ácido 3-metilbutanóico	Chulé ⁽¹⁾	
	ácido hexanóico	ácido hexanóico	Fumo; Floral; Farmácia ⁽¹⁾⁽³⁾	
	ácido dodecanóico	ácido dodecanóico	Sabão ⁽³⁾	
Álcoois	<i>trans</i>-2-hexenol	(<i>E</i>)-hex-2-en-1-ol	Herbáceo ⁽¹⁾	
	2-feniletanol	2-feniletan-1-ol	Floral; Rosas ⁽¹⁾	

* (Granja-Soares, 2019) ** Todas as estruturas químicas foram feitas através do programa *ChemSketch*.
(1): (Caldeira, 2004); (3): (Caldeira *et al.*, 2008).

4. Análise dos compostos voláteis

A técnica mais utilizada para a identificação e quantificação de compostos voláteis tem sido a cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. Como a maioria dos compostos odorantes existe em quantidade reduzida, é normalmente necessária uma etapa prévia de extração e concentração dos mesmos (Caldeira *et al.*, 2016). Para tal têm sido utilizadas diferentes técnicas como a microextração em fase sólida (SPME) em modo *headspace* ou a extração líquido-líquido seguida de uma etapa de concentração, antes da análise por cromatografia de gases (Cabrita *et al.*, 2012; Caldeira *et al.*, 2004).

Neste trabalho, após prévia diluição das amostras de aguardente devido ao elevado teor alcoólico da aguardente (Bertrand *et al.*, 1978), a separação foi feita com recurso à extração líquido-líquido por solvente, seguida de uma etapa de concentração. Os compostos voláteis minoritários foram identificados por cromatografia de gases acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e quantificados por cromatografia de gases acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID).

4.1 Extração líquido-líquido

A extração por solvente é um processo de separação baseado nas diferenças de solubilidade. Assim, usa-se um solvente para solubilizar e separar o soluto de outras substâncias presentes no solvente, podendo realizar-se por dois processos distintos: extração sólido-líquido e extração líquido-líquido.

Para a realização desta dissertação recorreu-se à extração líquido-líquido. Este é um método de separação utilizado para transferir um determinado soluto de um solvente para outro, a separação acontece em função da solubilidade do composto de interesse pela fase orgânica. Ambos os solventes devem ser imiscíveis. Normalmente um dos solventes é uma mistura aquosa (frequentemente é água) e o outro é um solvente ou mistura de solventes orgânicos.

4.2 Cromatografia de gases

A cromatografia é uma técnica que se utiliza para separar os componentes de uma mistura. Essa separação é feita através das diferenças de velocidade dos componentes que eluem pela fase móvel, devido às diversas interações com a fase estacionária (Peres, 2002; Skoog *et al.*, 2006).

A cromatografia de gases é a técnica mais utilizada para separar compostos voláteis em misturas complexas. Tem um ótimo poder de resolução que possibilita analisar várias substâncias numa mesma amostra e em pequenas quantidades. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é um líquido pouco volátil (e termicamente estável) e a separação é feita através de processos químicos e físicos. A fase móvel é um gás de arraste quimicamente inerte (hidrogênio, hélio ou azoto), sendo esse gás o transportador da amostra ao longo da coluna até ao detetor. O detetor é onde os compostos já separados são detetados através da transformação das variações na composição do gás de arraste em sinais elétricos (Peres, 2002).

Para utilizar este tipo de técnica, as substâncias a analisar devem ser suficientemente voláteis para serem eluídas e detetadas na temperatura operacional (Biniecka & Caroli, 2011).

Existem diferentes tipos de detetores que têm sido aplicados na cromatografia de gases. Um detetor ideal deve apresentar diversas características, como: boa sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade, tempo de resposta curto, alta confiabilidade, facilidade de uso, etc. (Skoog *et al.*, 2006). Assim, para quantificar os compostos voláteis minoritários deste trabalho foi utilizado um GC-FID. Este detetor de ionização em chama que se acopla à cromatografia de gases é formado por um campo elétrico e uma chama para queimar a amostra (Peres, 2002). Este tipo de detetor é muito útil para analisar amostras orgânicas, é fácil de usar e exibe uma alta sensibilidade, larga faixa linear de resposta e baixo ruído. Apresenta a desvantagem de destruir a amostra na etapa de combustão (Skoog *et al.*, 2006).

A quantificação dos compostos voláteis através de um GC-FID baseia-se na comparação da área de um pico analítico e a área dos picos de padrões. A maioria dos equipamentos cromatográficos da atualidade já está ligada a computadores que fornecem este tipo de informações referentes à área medida. Para a quantificação dos compostos voláteis deste trabalho recorreu-se ao método do padrão interno. Este método minimiza incertezas, obtendo-se maior precisão na quantificação. Basicamente, os padrões internos são

introduzidos na amostra e nos padrões de calibração e a razão entre a área do pico analítico e a do pico do padrão interno é utilizada como parâmetro analítico (Skoog *et al.*, 2006).

A cromatografia de gases é considerada uma ótima ferramenta para confirmar a presença ou ausência de compostos específicos numa mistura. No entanto, torna-se uma técnica limitada na análise qualitativa de amostras complexas. Nestes casos, para identificação dos compostos, a cromatografia de gases pode ser acoplada a diversas técnicas, sendo a ligação à espectrometria de massa a técnica mais utilizada devido à elevada sensibilidade e universalidade de detecção conseguida (Caldeira, 2004). Esta técnica tem um grande poder de detecção, mas também fornece informações sobre a fragmentação dos componentes eluídos, permitindo conhecer o peso molecular, a estrutura e os grupos funcionais de cada composto (Biniecka & Caroli, 2011).

Através da ligação de um espectrómetro de massas à cromatografia gasosa, é possível obter-se o peso molecular dos compostos a partir de quantidades de amostras muito pequenas. Nesta técnica as moléculas presentes na amostra são bombardeadas por um feixe de elétrons com energia suficientemente elevada para quebrar as moléculas em estudo, dando origem a um espectro de massa. As massas desses fragmentos são analisadas e caracterizadas através das relações massa/carga (m/z) e abundâncias relativas sendo possível obter-se informações acerca da estrutura da molécula (Pavia *et al.*, 2010).

5. Análise sensorial

A análise sensorial é a “ciência que está relacionada com a avaliação dos atributos organolépticos de um produto, mediante os sentidos” (Norma ISO 5492:2008), ou seja, baseia-se na percepção humana dos atributos de um produto.

Ao longo dos anos, tem vindo a ser cada vez mais reconhecido o papel importante da análise sensorial na produção e melhoria dos produtos alimentares. Como tal, têm sido efetuados alguns estudos (Lesdéma *et al.*, 2016; Marx *et al.*, 2017; Panagou *et al.*, 2008) para que haja uma melhoria na realização desta técnica, como: melhorar os métodos utilizados e/ou criar instrumentos que facilitem o processo de análise como é o caso das línguas eletrónicas e do nariz eletrónico. No entanto, estes instrumentos continuam a ser complementares aos testes sensoriais. Os testes sensoriais têm sido os utilizados em diversos estudos (Caldeira, 2004; Caldeira *et al.*, 2002, 2006, 2013, 2017; Canas *et al.*,

2016; Cejudo-Bastante *et al.*, 2011; Granja-Soares *et al.*, 2020; Hernández-Orte *et al.*, 2009).

Visto que aplicar a análise sensorial requer a utilização dos sentidos humanos (olfato, audição, visão, tato e gosto), é importante perceber que existem fatores psicológicos e fisiológicos que podem afetar os sentidos de forma que os resultados obtidos não sejam fidedignos e que, portanto, devem ser evitados. Os fatores psicológicos são diversos e podem distinguir-se em diferentes categorias: erro de estímulo, erro lógico, erro de expectativa, erro da habituação, falta de motivação, erro de associação, efeito de grupo, sugestão múltipla, erro de tendência central, efeito de contraste e efeito temporal (Alvelos, 2002; Carmo, 2018). Os fatores fisiológicos, como o nome indica, estão relacionados com a capacidade ou incapacidade fisiológica. Exemplos de fatores fisiológicos são a ageusia, a adaptação sensorial, o daltonismo, a anosmia, a hiposmia ou ainda problemas de saúde como problemas de pele, na cavidade oral ou febre, gripe e constipações (Gregorio *et al.*, 2014).

A identificação e quantificação dos compostos voláteis existentes na aguardente vínica não permitem avaliar a contribuição de cada composto no seu aroma final. Assim, a análise sensorial é um complemento à análise química pois possibilita uma melhor compreensão do aroma tornando-se uma importante ferramenta para determinar as propriedades organolépticas da aguardente e as relacionar com os compostos odorantes existentes.

Este tipo de análise é feito através da reunião de um determinado número de provadores, especializados ou não especializados (conforme o tipo de prova), que avaliam as sensações obtidas e interpretam as características intrínsecas dos produtos em estudo (Carmo, 2018).

Existem três tipos de testes frequentemente utilizados na análise sensorial: testes afetivos, testes discriminativos e testes descritivos (Bech *et al.*, 1994).

Os testes afetivos (ou testes de preferência) são destinados aos consumidores. Estes analisam diversas amostras e avaliam as suas preferências (Carmo, 2018).

Os testes discriminativos (ou testes de diferença) são testes de escolha forçada e de comparação entre amostras que servem para detetar diferenças sensoriais (Carmo, 2018). Para este tipo de provas é realizado um questionário muito simples e recorre-se a um número elevado de provadores (cerca de 20 pessoas) que não necessitam de grande treino. São provas utilizadas numa primeira abordagem da análise sensorial ou aplicadas

no treino e avaliação de um grupo de prova (Caldeira, 2004). Podem ser divididos em testes de diferença global (teste triangular, teste duo-trio, teste de diferenças simples, teste “A” e “não A”) e testes de diferença de atributos (testes de comparação múltipla, teste de ordenação, teste pareado) (Carmo, 2018).

Os testes descritivos têm o intuito de provadores treinados conseguirem descrever, identificar diferenças e avaliar a intensidade de atributos sensoriais específicos dos produtos (Carmo, 2018). Podem dividir-se entre provas de ordenação e provas de avaliação (Caldeira, 2004). Destas últimas destaca-se a prova de análise descritiva quantitativa, tipo de prova utilizado no âmbito desta dissertação.

5.1 Análise descritiva quantitativa

A análise descritiva quantitativa tem como objetivo caracterizar um produto com o mínimo de descritores, dando um máximo de informações sobre as propriedades sensoriais desse produto.

Para realizar este tipo de análise, recorre-se a um grupo de prova analítico (Caldeira, 2004) constituído por um painel de provadores previamente escolhidos e treinados (Stone *et al.*, 1980). É muito importante existir a fase de treino pois irá permitir que cada provador memorize aromas e sabores característicos e se familiarize com o vocabulário específico.

No que diz respeito às aguardentes, foi criada uma ficha de prova descritiva quantitativa (Caldeira *et al.*, 1999), de forma a avaliar o impacto de diversos fatores na cor, aroma e sabor das aguardentes. A ficha utilizada para a realização deste trabalho apresenta-se no Anexo I e o procedimento mais detalhado será descrito na parte experimental.

A análise dos resultados sensoriais e da quantificação dos compostos odorantes permitiu verificar, tal como apresentado anteriormente, que muitos dos atributos sensoriais estão bem correlacionados com os compostos voláteis presentes nas aguardentes vnicas envelhecidas (Caldeira, 2004; Caldeira *et al.*, 1999, 2008; Janáčová *et al.*, 2008) (Tabela 1-5).

6. Evolução em garrafa

Apesar do considerável conhecimento sobre as modificações em vasilha de madeira e/ou depósito com fragmentos de madeira, pouco se sabe do efeito no aroma quando a aguardente é armazenada em garrafa. No entanto, vários estudos já têm sido feitos acerca do armazenamento do vinho em garrafa (Alamo-Sanza *et al.*, 2019; Arfelli *et al.*, 2011; Cassino *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2014; Giuffrida de Esteban *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016; Ugliano, 2013; Wang *et al.*, 2018).

O vinho, quando envelhecido em garrafa, tem um contacto mínimo com o oxigénio. Nesta fase, o vinho evolui e origina alterações na sua cor e melhorias sensoriais ao nível do aroma e sabor. Esta evolução varia em função do vinho utilizado (Ugliano, 2013), sendo que a sua composição inicial e as condições da adega são fatores que podem influenciar a velocidade da sua evolução. Os parâmetros que se devem ter em conta durante o envelhecimento são: o potencial *redox*, o pH, a humidade e a temperatura. É muito importante evitar a exposição à luz solar pois pode causar a formação de radicais livres que irão oxidar prematuramente o vinho. As flutuações excessivas de temperatura são igualmente um fator a ser evitado (Cassino *et al.*, 2019).

A evolução do vinho envelhecido em garrafa tem demonstrado resultados distintos consoante o tratamento utilizado (alternativo ou tradicional). As diferenças na composição química dos vinhos têm sido descritas pelo aumento da cor do vinho, dando ênfase ao potencial do uso do sistema alternativo para obter vinhos idênticos aos envelhecidos em vasilhas (Alamo-Sanza *et al.*, 2019).

Alamo-Sanza *et al.*, (2019), realizaram o primeiro estudo de vinhos tintos, tratados com chips e aduelas, com adição de pequenas doses de oxigénio, após 10 anos em garrafa. Através deste estudo, puderam concluir que a evolução do vinho é mais rápida quando é realizado o sistema alternativo. Após 10 anos em garrafa, os vinhos tratados pelo sistema tradicional apresentavam menor diminuição na intensidade da cor. Contudo, as propriedades dos vinhos tratados por ambos os sistemas foram semelhantes.

Pelo exposto, é possível que o efeito na aguardente seja idêntico, mas, não tendo sido ainda alvo de estudos, torna-se um dos grandes desafios deste trabalho.

Capítulo 2 - Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a evolução do aroma de aguardentes vínicas envelhecidas, após a sua conservação em garrafa por um período de seis meses. Foram estudadas aguardentes vínicas envelhecidas, durante um ano, em vasilha (sistema tradicional) e em sistema alternativo (depósito com aduelas de madeira e diferentes estratégias de microoxigenação), utilizando-se duas espécies de madeira (castanheiro e carvalho). Para o estudo do aroma das aguardentes realizou-se a análise sensorial das diferentes amostras em estudo e a quantificação e identificação dos compostos odorantes dessas mesmas aguardentes, respetivamente por GC-FID e GC-MS.

Capítulo 3 – Procedimento Experimental

1. Ensaio e Amostragem

A aguardente vínica utilizada foi produzida pela Adega Cooperativa da Lourinhã, tendo sido obtida por destilação em coluna.

As suas características analíticas eram as seguintes:

- Teor alcoólico: 78,3 v/v;
- pH: 5,33;
- Acidez total: 0,12 g/L A.P. (expressa em ácido acético);
- Acidez volátil: 0,09 g/L A.P. (expressa em ácido acético)

A mesma aguardente foi distribuída por diferentes modalidades de envelhecimento. Parte da aguardente foi envelhecida em vasilhas (B) de madeira com 250 L de capacidade e queima média mais (QM+), produzidas pela tanoaria J.M. Gonçalves (Palaçoulo, Portugal). Foram utilizados dois tipos de madeira para a construção das vasilhas: Carvalho *Limousin* (L) e Castanheiro (C). Realizaram-se duas réplicas (1 e 2) para cada tipo de vasilha, ou seja, um total de 4 vasilhas.

A outra parte da aguardente, envelheceu em garrações de vidro de 50 L de capacidade, com introdução de uma quantidade definida de aduelas, de forma a imitar a relação superfície/volume da vasilha (250 L). São aduelas com queima média mais e também produzidas pela tanoaria J.M. Gonçalves (Palaçoulo, Portugal). Estas foram obtidas a partir das mesmas madeiras: Carvalho *Limousin* (L) e Castanheiro (C).

Foi aplicada microoxigenação em 3 das 4 modalidades diferentes variando apenas os dias (15, 30 e 60 dias) durante os quais se aplicou o maior fluxo (Canas *et al.*, 2020). Estas três modalidades foram submetidas a um fluxo de oxigénio de 2 mL/L/mês durante os primeiros 15, 30 e 60 dias, respetivamente. Após este tempo, foram submetidas diariamente a 0,6 mL/L/mês até ao final dos 365 dias. Na quarta modalidade foi aplicado azoto em substituição do oxigénio e o fluxo de azoto foi de 20 mL/L/mês. A aplicação de oxigénio puro (X50S Food, Gasin, Portugal) foi efetuada com um difusor múltiplo (VISIO 6, Vivelys, França) com difusores de cerâmica. O azoto puro (X50S Food, Gasin, Portugal), foi aplicado com um aparelho específico (Gasin, Portugal). Para estas quatro modalidades existem duas réplicas para cada tipo de madeira utilizada, originando um total de 16 garrações.

Assim, o ensaio total foi constituído por 20 unidades experimentais, conforme se apresenta no esquema da Fig. 6.

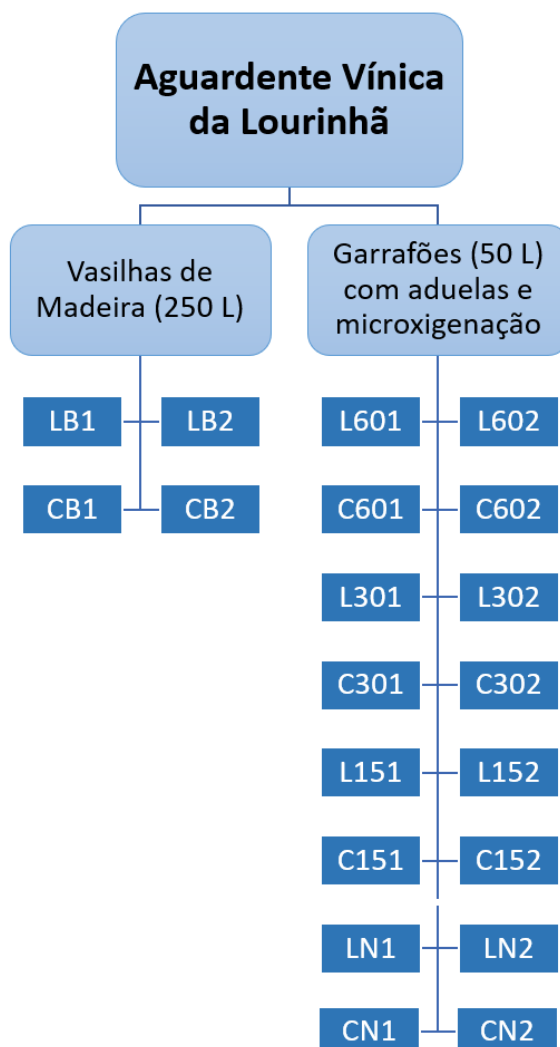


Figura 6: Esquema de ensaio e identificação de amostras.

Após um ano de envelhecimento, as aguardentes de todas as unidades experimentais foram engarrafadas. Recolheram-se duas garrafas de cada unidade experimental (amostragem G0) para a realização da análise sensorial e análise físico-química. As restantes garrafas foram colocadas na cave do INIAV em Dois Portos. Ao fim de seis meses realizaram-se as análises de uma nova amostragem (G6). No total, foram analisadas 80 amostras.

2. Análise dos compostos voláteis

Nas amostras de aguardentes do ensaio, procedeu-se à quantificação de alguns compostos voláteis minoritários, anteriormente identificados como compostos odorantes (Caldeira *et al.*, 2008). Para realizar esta análise foram realizadas inicialmente etapas de extração e concentração, após as quais se realizou a quantificação por GC-FID e a identificação por GC-MS.

2.1. Extração e concentração

Os compostos voláteis foram analisados conforme o método adotado por Caldeira *et al.*, (2004), com as modificações introduzidas por Caldeira *et al.*, (2010). As aguardentes foram diluídas para 20% (v/v) com água ultrapura (obtida através do arium®comfort I da Sartorius Lab Instruments, Alemanha).

Antes de iniciar a extração, procedeu-se à adição de dois padrões internos: 1,6 mL de 5-metil-2-hexanol (ALDRICH) e 0,5 mL de 3,4-dimetilfenol (Acros Organics) a 100 mL de aguardente previamente diluída.

Realizou-se então uma extração líquido-líquido com adição de diclorometano (Honeywell Riedel-de Haën, Steinheim, Alemanha), seguida de ultrasonificação e separação de fases.

As fases orgânicas de cada amostra foram recolhidas, desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas por lã de vidro e concentradas num evaporador rotativo a 42,5 °C até a um volume de cerca de 0,25 mL. Os extratos de compostos voláteis obtidos foram então conservados no congelador (-20 °C) até à sua análise por GC-FID e GC-MS.

2.2 Análise por GC-FID

Cada extrato foi analisado em duplicado num cromatógrafo Agilent Technologies série 6890 (Wilmington, DE, EUA), equipado com detetor FID e com uma coluna capilar de sílica fundida de polietilenoglicol (30 m, 0,32 mm e 0,25 µm de espessura) da INNOWax of J&W Scientific, Folsom, CA, EUA.

As condições de trabalho foram as seguintes:

- Volume de injeção: Entre: 0,4 µL e 0,8 µL;
- Temperatura do injetor e detetor: 250 e 260 °C;
- Gás de arraste: Hidrogénio (2,4 mL/min e razão de divisão 1:25);
- Programa de temperatura do forno: a temperatura inicial do forno foi de 35 °C, temperatura que se manteve durante 6 minutos, seguido de uma rampa inicial de 3,5 °C/min até atingir os 55 °C, posteriormente seguiu-se uma segunda rampa de 7,5 °C/min até atingir os 130 °C e finalmente uma terceira rampa de 5 °C/min até alcançar os 210 °C. Esta temperatura foi mantida durante 30 minutos. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 67 minutos.

Foram analisadas soluções hidroalcoólicas de padrões de concentração conhecida, em condições semelhantes que permitiram o estabelecimento de curvas de calibração e a quantificação dos compostos odorantes. Os resultados apresentam-se em mg/L.

2.3 Análise por GC-MS

Os compostos voláteis foram identificados por GC-MS utilizando-se as condições descritas por *Caldeira et al.*, (2010) e *Caldeira et al.*, (2016).

Cada amostra foi injetada no sistema de cromatografia (Magnum, Finnigan Mat, San Jose CA) provido de uma coluna capilar de sílica fundida de polietilenoglicol (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm de espessura) da HP-INNOWax of J&W Scientific Folsom CA, EUA.

As condições de trabalho foram as seguintes:

- Volume e modo de injeção: 0,4 µL - split;
- Temperatura do injetor e da linha de transferência: 250 °C;
- Gás de arraste: Hélio (83 kPa de pressão e razão de divisão 1:60);
- Programa de temperatura do forno: A temperatura inicial do forno foi de 35 °C, temperatura que se manteve durante 6 minutos, seguido de uma rampa inicial de 3,5 °C/min até atingir os 55 °C, posteriormente seguiu-se uma segunda rampa de 7,5 °C/min até atingir os 130 °C e finalmente uma terceira rampa de 5 °C/min até alcançar os 210 °C. Esta temperatura foi mantida durante 30 minutos. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 73 minutos.
- O espectrómetro de massa operou no modo de impacto eletrónico a 70 eV e em modo *scan* num intervalo de massas entre 20-340 *m/z*.

A identificação dos compostos foi feita através da comparação dos índices de retenção de cada composto e dos espetros de massa de compostos padrão analisados nas mesmas

condições. Os espectros de massa obtidos foram analisados e comparados com espectros de massa obtidos através da biblioteca NIST.

Para realizar os cálculos dos índices de retenção, foi injetada uma solução de alcanos (C9-C30), nas mesmas condições de trabalho das amostras (Philips, 1989).

3. Análise Sensorial

Todas as amostras de aguardente vínica envelhecida foram diluídas com água de forma a reduzir o teor alcoólico para 40% v/v e avaliadas por provadores, de acordo com o procedimento anteriormente descrito (Granja-Soares *et al.*, 2020).

As sessões de prova foram efetuadas na sala de prova do INIAV, equipada de acordo com a Norma ISO 8589:2007, sob luz natural e temperatura ambiente de cerca de 20 °C. As amostras foram servidas em copo de prova (Norma ISO 3591:1977) contendo cada um cerca de 30 mL de aguardente. A análise sensorial foi realizada com recurso a 9 provadores previamente treinados e selecionados pelo INIAV, de acordo com a metodologia de Caldeira *et al.*, 1999 e concordante com a Norma ISO 8586:2012.

Idealmente, o número de provadores deverá estar entre 6 e 10 (Heymann *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 1980) pelo que o número de provadores a que se recorreu está dentro do recomendado.

Devido à grande quantidade de amostras (40 em cada tempo avaliado), estas foram distribuídas aleatoriamente por 5 sessões, avaliando-se 9 amostras em cada sessão. Em cada sessão foram avaliadas 8 amostras mais uma amostra repetida aleatoriamente para avaliar a fiabilidade e acuidade dos provadores (Caldeira *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 1980). Para além das amostras, foi ainda disponibilizada água a todos os provadores para que pudessem neutralizar o paladar entre as amostras provadas. Todas as amostras foram codificadas com três dígitos aleatórios e apresentadas a cada provador de forma balanceada para que o efeito de apresentação e posição relativa inter-amostras fosse eliminado (Macfie *et al.*, 1989).

As sessões foram realizadas no período da manhã, de modo a evitar a diminuição da acuidade sensorial e os efeitos do estado de saciedade.

Foi pedido aos provadores que avaliassem os atributos sensoriais com recurso a uma escala de intensidade (0-sem perceção a 5-maior intensidade de perceção). Estes

atributos incluíram cinco atributos de cor (citrino, palha, dourado, topázio e esverdeado), dezassete atributos de aroma orthonasal (álcool, frutado, floral, baunilha, madeira, ranço bom, especiarias, caramelo, torrado/queimado, frutos secos, fumo/cinzas, café, adocicado, herbáceo, caudas, acetato de etilo/cola/verniz e borracha) e doze atributos gustativos (doce, macio, queimante, adstringência, aspereza, amargo, corpo, untuosidade, evolução, complexidade, aroma de boca e persistência). Foi ainda solicitado aos provadores que avaliassem a qualidade geral das amostras de aguardente vínica envelhecida, numa escala de 0 a 20.

Todas as avaliações dos provadores foram recolhidas pelo *software* Tastel.

4. Análise estatística

Todos os resultados analíticos e sensoriais obtidos a partir das amostras de aguardente vínica envelhecida logo após 365 dias de envelhecimento e após 6 meses de armazenamento em garrafa, foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) a 3 fatores. Os fatores avaliados foram o tipo de madeira, a modalidade de oxigenação e o tempo em garrafa. A ANOVA realizada permitiu avaliar a influência dos fatores em estudo na composição volátil e sensorial destas aguardentes.

Foi avaliada a homogeneidade de variância (Cochran). Também se realizou o teste de comparação de médias da diferença mínima significativa (LSD), desenvolvido por Fisher, para comparar as médias, quando foram encontrados efeitos estatisticamente significativos ($\alpha < 0,05$).

Para o conjunto de variáveis em que se detetou efeitos significativos com a ANOVA, foi feita uma análise multidimensional de resultados, a análise de componentes principais (PCA). Este tipo de análise é utilizado para resumir a variabilidade geral, tendo uma grande capacidade para fornecer informações resultantes de vários conjuntos de dados (Jombart *et al.*, 2010). Realizar uma PCA ajuda a estabelecer critérios de diferenciação em função das variáveis utilizadas reduzindo a dimensão da matriz de dados original, mas mantendo a variabilidade. Assim, é possível explicar diferenças e determinar quais as variáveis que mais contribuem para essas diferenças (Câmara *et al.*, 2006).

Os cálculos foram efetuados através da utilização do programa STATISTICA (data analysis software system), versão 7, da StatSoft, Inc. (2004).

Capítulo 4 – Resultados e discussão

1. Análise dos compostos odorantes

Este trabalho focou-se nos compostos odorantes relevantes que pudessem estar presentes nas amostras estudadas. A equipa de orientação deste trabalho possui experiência sobre os mesmos em trabalhos anteriores (Caldeira, 2004; Caldeira *et al.*, 2008).

Apesar de terem sido identificados muitos compostos odorantes nas aguardentes em estudo (Fig. 7), não foi possível quantificar alguns compostos odorantes designadamente 2-metilbutanoato de etilo, isovalerato de etilo, etilguaiacol, malato de dietilo e 4-etilfenol porque se encontravam em teores vestigiais e/ou ausentes nestas amostras de aguardentes.

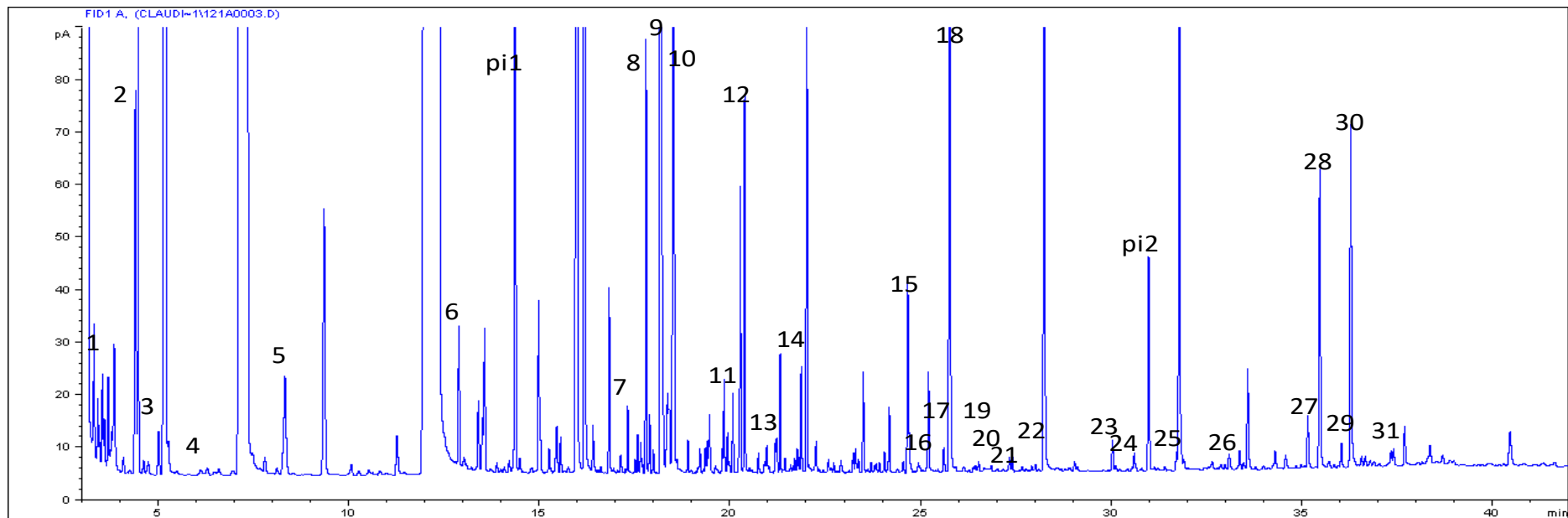


Figura 7: Cromatograma de um extrato de aguardente envelhecida em vasilha de madeira de castanheiro.

1: isobutirato de etilo; 2: acetato de isobutilo; 3: butirato de etilo; 4: isovalerato de etilo; 5: acetato de isoamilo; 6: hexanoato de etilo; pi1: 5-metil-2-hexanol (1° padrão interno); 7: *trans*-2-hexenol; 8: octanoato de etilo; 9: ácido acético; 10: furfural; 11: linalol; 12: 5-metilfurfural; 13: ácido butanóico; 14: ácido isovalérico; 15: ácido hexanóico; 16: guaiacol; 17: *trans* β-metil-γ-octalactona; 18: 2-feniletanol; 19: *cis* β-metil-γ-octalactona; 20: 4-metilguaiacol; 21: 4-etilguaiacol; 22: malato de dietilo; 23: eugenol; 24: 4-etilfenol; pi2: 3,4-dimetilfenol (2° padrão interno); 25: siringol; 26: 4- metilsiringol; 27: ácido dodecanóico; 28: HMF; 29: 4- alilsiringol; 30: vanilina; 31: acetovanilona.

1.1 Fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e acetovanilona

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) obtidos para a quantificação dos fenóis voláteis (guaiacol, 4-metilguaiacol, eugenol, siringol, 4-metilsiringol e 4-alilsiringol), vanilina e acetovanilona nas aguardentes em estudo.

Tabela 6: Resultados da ANOVA para os fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e acetovanilona (média e desvio padrão).

Code		guaiacol	4-metilguaiacol	eugenol	Siringol	4-metilsiringol	4-alilsiringol	vanilina	acetovanilona	
G6	Castanho	B	0,11±0,02 a	0,05±0,04 a	0,33±0,00 c	0,28±0,08 a	0,36±0,04 a	0,44±0,03 cd	7,74±0,23 ef	0,34±0,05 b
		15	0,51±0,06 bc	0,31±0,04 a	0,28±0,02 a	1,39±0,07 b	1,24±0,07 c	0,40±0,07 b	7,52±0,72 ef	0,80±0,15 e
		30	0,45±0,03 b	0,28±0,00 a	0,30±0,03 ab	1,43±0,09 b	1,24±0,00 c	0,38±0,02 b	7,14±0,14 e	0,81±0,02 e
		60	0,46±0,01 bc	0,25±0,00 a	0,28±0,01 ab	1,48±0,09 b	1,26±0,01 c	0,42±0,05 bc	8,21±0,36 f	0,97±0,01 f
	Carvalho	N	0,48±0,07 bc	0,28±0,05 a	0,23±0,02 a	1,30±0,05 b	1,09±0,03 b	0,42±0,00 b	4,97±0,95 bc	0,77±0,05 e
		B	0,03±0,02 a	0,01±0,02 b	0,33±0,01 c	0,20±0,01 a	0,28±0,02 a	0,30±0,01 a	3,35±0,19 a	0,11±0,05 a
		15	0,56±0,05 d	0,55±0,06 b	0,27±0,01 ab	2,12±0,58 c	1,28±0,19 c	0,41±0,06 bc	4,95±0,04 b	0,59±0,07 c
		30	0,56±0,05 cd	0,39±0,01 b	0,29±0,00 ab	2,16±0,11 c	1,23±0,01 c	0,50±0,01 de	6,39±1,08 d	0,65±0,09 cd
G6	Castanho	60	0,58±0,01 d	0,46±0,05 b	0,33±0,05 c	2,46±0,21 d	1,41±0,11 d	0,51±0,05 e	5,93±0,10 cd	0,68±0,03 d
		N	0,57±0,01 d	0,56±0,21 b	0,30±0,02 bc	2,63±0,09 d	1,44±0,06 d	0,54±0,02 f	4,49±0,88 a	0,64±0,05 d
		B	0,10±0,01 a	0,09±0,01 a	0,34±0,02 c	0,25±0,02 a	0,34±0,02 a	0,42±0,03 cd	7,96±0,60 ef	0,41±0,01 b
		15	0,52±0,00 bc	0,29±0,03 a	0,26±0,01 a	1,58±0,09 b	1,12±0,03 bc	0,36±0,02 b	7,63±0,37 ef	0,83±0,04 e
	Carvalho	30	0,48±0,09 b	0,31±0,01 a	0,27±0,01 ab	1,49±0,08 b	1,05±0,10 b	0,33±0,02 b	7,16±0,05 e	0,83±0,03 e
		60	0,55±0,09 bc	0,33±0,00 a	0,27±0,01 ab	1,44±0,07 b	1,13±0,02 bc	0,36±0,03 bc	7,74±0,22 f	0,87±0,03 f
		N	0,55±0,03 bc	0,31±0,02 a	0,29±0,03 a	1,54±0,03 b	1,03±0,02 b	0,32±0,01 b	5,39±0,49 bc	0,88±0,02 e
		B	0,07±0,01 a	0,04±0,01 a	0,32±0,02 c	0,25±0,00 a	0,31±0,01 a	0,27±0,01 a	3,83±0,11 a	0,20±0,01 a
Carvalho	15	0,63±0,05 d	0,27±0,01 a	0,28±0,01 ab	2,26±0,02 c	1,07±0,01 b	0,37±0,02 bc	5,13±0,21 b	0,61±0,04 c	
	30	0,62±0,03 cd	0,24±0,01 a	0,28±0,02 ab	2,28±0,21 c	1,02±0,03 b	0,43±0,00 de	5,42±0,36 d	0,64±0,07 cd	
	60	0,62±0,03 d	0,26±0,02 a	0,32±0,02 c	2,82±0,04 d	1,18±0,05 c	0,44±0,04 e	5,81±0,35 cd	0,68±0,03 d	
	N	0,75±0,18 d	0,27±0,04 a	0,31±0,04 bc	2,89±0,12 d	1,31±0,11 cd	0,51±0,01 f	3,77±0,03 a	0,72±0,07 d	
Tempo [T]		2,8**	7,5***	n.s.	0,8*	4,2***	10,6***	n.s.	n.s.	
Madeira [W]		5,1***	3,7*	9,5*	31,3***	1,1**	7,6***	58,7***	28,0***	
Modalidade [M]		82,2***	46,2***	32,3***	60,0***	85,6***	10,8***	17,6***	67,9***	
TxW		n.s.	31,5***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1,3*	n.s.	n.s.	n.s.	
WxM		4,3*	n.s.	21,7*	5,6***	5,6***	62,3***	18,0***	n.s.	
Erro		5,6	11,1	36,4	2,4	2,2	8,7	5,6	4,0	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

1.1.1. Efeito da madeira

O teor de todos os compostos foi significativamente influenciado pelo fator madeira, embora os níveis de significância e a percentagem da variação total observada, sejam distintos para os diferentes compostos. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de guaiacol (5,1% da variação total), siringol (31,3% da variação total), 4-alilsiringol (7,6% da variação total), vanilina (58,7% da variação total) e acetovanilona (28,0% da variação total), muito significativo ($\alpha < 0,01$) no teor de 4-metilsiringol (1,1% da variação total) e efeito significativo ($\alpha < 0,05$) nos teores de 4-metilguaiacol (3,7% da variação total) e eugenol (9,5% da variação total).

Com exceção das aguardentes envelhecidas em vasilha, onde as concentrações de guaiacol e 4-alilsiringol foram mais elevadas nas amostras que foram envelhecidas em madeira de castanheiro, estes compostos encontraram-se com maiores concentrações nas aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho. O mesmo acontece para o composto 4-metilguaiacol apesar de, após 6 meses em garrafa, as diferenças entre madeiras não serem tão perceptíveis e chegando a concentração das aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro a ser ligeiramente mais elevada.

As concentrações do composto eugenol são muito semelhantes entre as diferentes madeiras.

Com o composto siringol acontece algo semelhante ao composto guaiacol, ou seja, as concentrações são predominantemente mais elevadas nas aguardentes que provêm do envelhecimento em madeira de carvalho, com exceção das que são envelhecidas em vasilhas onde as concentrações são mais elevadas nas envelhecidas em madeira de castanheiro. No entanto, para este composto, após 6 meses em garrafa, foram encontradas concentrações muito semelhantes nas aguardentes envelhecidas em vasilhas de ambas as madeiras. Também Caldeira *et al.* (2010) encontrou maiores teores de siringol em aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho *Limousin* em comparação com a madeira de castanheiro ao fim de 6 meses de envelhecimento.

Para o composto 4-metilsiringol pode observar-se que o seu teor nas aguardentes envelhecidas em vasilhas é mais elevado nas que são envelhecidas em madeira de castanheiro, mas nas restantes modalidades existe uma variação dependente de outros fatores (modalidade e tempo). Assim, para o fator madeira, as concentrações deste composto não são facilmente padronizáveis.

As concentrações de vanilina foram sempre significativamente mais elevadas nas aguardentes envelhecidas com madeira de castanheiro comparativamente com as envelhecidas em madeira de carvalho. O mesmo acontece para o composto acetovanilona mas a diferença de concentrações entre as diferentes madeiras não é tão acentuada. No caso da vanilina verifica-se que o efeito da madeira é o que mais contribui e que permite justificar a variabilidade total observada.

Destes resultados, apenas os obtidos para os compostos vanilina e acetovanilona estão de acordo com Granja-Soares *et al.* (2020), visto que, para estes autores, as maiores concentrações de todos estes compostos foram encontradas nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Também em Canas *et al.* (2013; 2019a), o composto vanilina apresentou maiores teores para a aguardente que esteve em contacto com a madeira de castanheiro. Este resultado sugere a ocorrência de uma oxidação mais pronunciada neste tipo de madeira. A maior oxidação pode ser explicada pelo facto de a madeira de castanheiro ter permeabilidade acrescida em relação à madeira de carvalho, o que faz com que apresente menos resistência à difusão do oxigénio através da madeira (Canas *et al.*, 2009).

1.1.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação tiveram um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) no teor dos vários compostos. Verificou-se que, com exceção do composto vanilina, este é o efeito que contribui com maior percentagem para explicar a variação observada.

Para os compostos guaiacol (82,2% da variação total), 4-metilguaiacol (46,2% da variação total), siringol (60,0% da variação total), 4-metilsiringol (85,6% da variação total) e acetovanilona (67,9% da variação total), as maiores concentrações foram encontradas nas aguardentes oriundas das modalidades com microoxigenação e azoto (sistema de envelhecimento alternativo), em comparação com as aguardentes provenientes das vasilhas (sistema de envelhecimento tradicional). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Caldeira *et al.* (2016) exceto os teores obtidos para 4-metilguaiacol e também com o estudo de Granja-Soares *et al.* (2020). Este comportamento sugere que a extração destes compostos é potencializada quando se opta por utilizar o sistema alternativo, sendo afetada pelo teor de oxigénio e/ou pode ter existido variabilidade no processo de queima das vasilhas e das aduelas (Caldeira *et al.*, 2013). No entanto, estes resultados não se encontram de acordo com o estudo de Caldeira

et al. (2010), onde os níveis destes compostos foram superiores nas aguardentes onde foram utilizadas vasilhas, em relação ao uso de aduelas.

O composto eugenol (32,3% da variação total) tem concentrações muito semelhantes entre todas as modalidades. Estes valores são muito diferentes dos apresentados por Caldeira *et al.* (2016), onde as concentrações de eugenol são claramente superiores quando a aguardente é envelhecida pelo sistema tradicional.

Os teores mais elevados de 4-alilsiringol (10,8% da variação total) foram encontrados nas aguardentes provenientes de envelhecimento em vasilhas quando a madeira de envelhecimento é o castanheiro. O contrário acontece quando a madeira de envelhecimento é o carvalho, visto que neste caso os valores de concentração mais elevados encontram-se nas modalidades de azoto e oxigénio (sistema de envelhecimento alternativo). No estudo de Caldeira *et al.* (2016), onde foi utilizada uma mistura destas duas madeiras, as concentrações obtidas deste composto foram muito semelhantes para ambos os sistemas de envelhecimento.

As concentrações mais baixas de vanilina (17,6% da variação total) foram encontradas na modalidade de azoto. Quando se usa a madeira de carvalho para o envelhecimento, também a aguardente envelhecida em vasilha tem concentrações inferiores em relação às modalidades de oxigénio. Em alguns estudos (Canas *et al.*, 2013; 2019a; Granja-Soares *et al.*, 2020), os maiores teores de vanilina foram encontrados na aguardente envelhecida através do sistema de envelhecimento alternativo com aduelas e micro-oxigenação.

1.1.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

Com exceção dos compostos, eugenol, vanilina e acetovanilona, onde se verificou que os seus teores não são significativamente influenciados pelo fator tempo, em todos os restantes compostos se verificam efeitos significativos, sendo, no entanto, o fator que contribui com menor percentagem para a explicação da variabilidade total observada. Assim, o tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores dos compostos 4-metilguaiacol (7,5% da variação total), 4-metilsiringol (4,2% da variação total) e 4-alilsiringol (10,6% da variação total), muito significativo ($\alpha < 0,01$) no teor do composto guaiacol (2,8% da variação total) e apenas efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no teor de siringol (0,8% da variação total).

As concentrações dos compostos, guaiacol e siringol têm tendência a aumentar ao longo do tempo de conservação em garrafa. Arfelli *et al.*, (2011) referem uma tendência contrária no caso do guaiacol no estudo de evolução de vinho tinto em garrafa.

O composto 4-metilguaiacol tem um comportamento que difere dependendo da madeira em análise. Quando se trata do envelhecimento em madeira de castanheiro a tendência é as concentrações aumentarem ao longo do tempo, mas quando se analisa as aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho, a maior predominância é as concentrações deste composto diminuírem ao longo do tempo.

Os compostos 4-metilsiringol e 4-alilsiringol sofreram, maioritariamente, um decréscimo nos valores de concentração com a passagem do tempo.

1.2 Isómeros da lactona β -metil- γ -octalactona

Na Tabela 7 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) obtidos para a quantificação dos dois isómeros (*trans* e *cis*) da β -metil- γ -octalactona nas aguardentes em estudo.

Tabela 7: Resultados da ANOVA para os isômeros da β -metil- γ -octalactona (média e desvio padrão).

Code		<i>trans</i> β -metil- γ -octalactona	<i>cis</i> β -metil- γ -octalactona	
G0	Castanho	B	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		15	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		30	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		60	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		N	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	Carvalho	B	0,15±0,22 c	1,36±0,04 b
		15	0,12±0,17 bc	0,69±0,48 b
		30	0,00±0,00 a	0,20±0,15 b
		60	0,06±0,06 ab	0,50±0,22 b
		N	0,04±0,06 ab	1,28±1,51 b
G6	Castanho	B	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		15	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		30	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		60	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
		N	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	Carvalho	B	0,33±0,15 c	1,46±0,17 b
		15	0,17±0,02 bc	0,89±0,02 b
		30	0,00±0,00 a	0,49±0,09 b
		60	0,07±0,05 ab	0,81±0,29 b
		N	0,07±0,10 ab	0,39±0,01 b
Tempo [T]		n.s.	n.s.	
Madeira [W]		32,6***	70,5***	
Modalidade [M]		10,4*	n.s.	
TxW		n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	
WxM		20,7*	n.s.	
Erro		36,3	29,5	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

1.2.1. Efeito da madeira

O teor dos dois isômeros, como esperado, apenas foi encontrado nas aguardentes de carvalho. Assim, a madeira tem uma influência altamente significativa ($\alpha < 0,001$) nestes dois compostos explicando para 32,6% da variação total observada no caso do *trans* β -metil- γ -octalactona e 70,5% no caso do *cis* β -metil- γ -octalactona. Estes resultados estão de acordo com o conhecimento existente sobre a ausência destes compostos nas aguardentes que envelhecem em madeira de castanheiro (Caldeira *et al.*, 2008). Tal como em trabalhos anteriores (Caldeira *et al.*, 2010), confirma-se a predominância do isômero *cis* em relação ao isômero *trans*.

1.2.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação apenas tiveram um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) nas concentrações do isómero *trans* de β -metil- γ -octalactona, explicando 10,4% da variação total observada. No entanto, é de salientar que a interação entre madeira e modalidade é significativa, indicando que a variação das condições de oxigenação tem uma resposta diferente em função da madeira. O mesmo efeito foi observado para o composto 4-alilsiringol.

Os teores mais altos nos dois isómeros foram encontrados nas aguardentes envelhecidas em vasilha e os mais baixos nas modalidades de oxigenação e azoto. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos (Caldeira *et al.*, 2010, 2016) mas em desacordo com Granja-Soares *et al.* (2020).

1.2.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

Foi possível verificar que nenhum dos teores dos dois isómeros deste lactona foi significativamente influenciado pelo tempo de conservação em garrafa.

1.3 Aldeídos furânicos e ácido acético

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) obtidos para a quantificação do ácido acético e dos aldeídos furânicos (furfural, 5-metilfurfural e hidroximetilfurfural (HMF)) nas aguardentes em estudo.

Tabela 8: Resultados da ANOVA dos aldeídos furânicos e ácido acético (média e desvio padrão).

Code		ácido acético	furfural	5-metilfurfural	HMF		
G0	Castanho	B	427,14±1,03 g	56,80±1,17 c	4,15±0,10 ab	15,40±1,03 f	
		15	246,85±5,94 d	83,39±20,61 e	5,17±2,59 d	13,06±7,05 ef	
		30	245,20±8,08 d	85,66±2,80 d	5,58±1,77 cd	13,12±2,97 de	
		60	254,33±4,90 de	97,44±2,63 e	4,69±0,12 b	13,06±0,97 cd	
		N	218,29±2,40 c	66,89±12,01 d	4,35±0,67 bc	10,84±0,79 cd	
	Carvalho	B	338,43±4,33 f	34,14±9,46 a	3,89±0,75 ab	8,52±2,45 abc	
		15	166,29±10,84 a	32,79±4,42 a	3,08±0,98 a	6,46±1,59 a	
		30	190,91±13,65 b	40,00±9,32 ab	4,88±0,08 bc	8,05±0,72 ab	
		60	194,59±8,35 b	52,25±8,39 c	4,97±0,50 b	8,80±1,59 ab	
		N	194,74±2,70 b	50,21±5,99 b	4,50±0,37 ab	10,50±0,41 bc	
G6	Castanho	B	344,84±3,67 f	65,22±2,01 c	4,60±0,48 ab	22,65±1,20 f	
		15	229,84±10,11 cd	102,76±0,89 e	8,59±0,22 d	21,06±0,47 ef	
		30	224,93±2,07 c	88,76±3,69 d	6,99±0,07 cd	16,56±0,28 de	
		60	215,07±7,28 c	98,66±0,97 e	4,65±0,27 b	12,61±0,64 cd	
		N	218,00±4,45 c	86,79±2,26 d	5,78±1,25 bc	14,54±2,63 cd	
	Carvalho	B	319,50±23,76 e	37,22±0,55 a	4,21±0,60 ab	12,52±1,28 abc	
		15	164,99±5,68 a	40,83±0,52 a	3,37±0,71 a	8,64±1,17 a	
		30	172,74±11,36 a	50,65±5,13 ab	5,81±0,45 bc	10,81±0,77 ab	
		60	181,19±5,52 ab	64,98±0,90 c	4,85±0,80 b	10,00±1,90 ab	
		N	183,85±12,66 ab	48,43±0,35 b	4,53±0,04 ab	12,26±1,22 bc	
		Tempo [T]		3,6***	3,4**	10,5**	17,4***
		Madeira [W]		20,3***	73,6***	18,2**	49,4***
		Modalidade [M]		69,5***	10,9***	8,6*	4,1*
		TxW		1,2*	n.s.	n.s.	n.s.
TxM		1,9**	n.s.	n.s.	n.s.		
WxM		1,4*	6,5**	34,2**	15,0**		
Erro		2,1	5,6	28,5	14,0		

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); ** muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

1.3.1. Efeito da madeira

Os teores de todos os compostos foram significativamente influenciados pelo fator madeira, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes compostos. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de ácido acético (20,3% da variação total), furfural (73,6% da variação total) e HMF (49,4% da variação total) e efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) no teor de 5-metilfurfural (18,2% da variação total). Verificou-se que, com exceção do ácido acético, este é o efeito que contribui com maior percentagem para explicar a variação observada.

As concentrações de ácido acético, furfural e HMF foram superiores nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. O composto 5-metilfurfural também teve, maioritariamente, concentrações superiores em aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. No estudo de Granja-Soares *et al.* (2020), os compostos furfural e HMF também apresentaram teores mais elevados nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Também Caldeira *et al.* (2013) referem maior conteúdo dos aldeídos furânicos nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro.

O maior conteúdo de aldeídos furânicos nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro pode ser devido ao facto de esta madeira ter maior quantidade de celulose (Fengel & Wegener, 1989).

1.3.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação tiveram um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de ácido acético (69,5% da variação total) e furfural (10,9% da variação total) e efeito significativo ($\alpha < 0,05$) nos teores de 5-metilfurfural (8,6% da variação total) e HMF (4,1% da variação total). Para o ácido acético verifica-se que o efeito das condições de oxigenação é o que mais contribui para a explicação da variabilidade total observada.

No caso do ácido acético e HMF, as maiores concentrações foram maioritariamente encontradas nas aguardentes provenientes de vasilhas (sistema de envelhecimento tradicional). As concentrações dos compostos furfural e 5-metilfurfural foram maioritariamente inferiores quando as aguardentes foram envelhecidas em vasilha.

Estes resultados não estão totalmente de acordo com alguns estudos (Caldeira *et al.*, 2010, 2016), visto que estes autores verificaram maiores concentrações dos quatro compostos nas aguardentes envelhecidas em vasilha. Contrariamente com o estudo apresentado por Granja-Soares *et al.* (2020) onde os aldeídos furânicos (furfural, HMF e 5-metilfurfural) apresentaram teores inferiores nas aguardentes envelhecidas em vasilha (sistema de envelhecimento tradicional). Também Canas *et al.* (2013) obtiveram resultados que diferem dos restantes sendo que, os teores de furfural e HMF foram superiores nas aguardentes envelhecidas em vasilha mas o conteúdo de 5-metilfurfural, nestas aguardentes, foi inferior.

1.3.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

O fator tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de ácido acético (3,6% da variação total) e HMF (17,4% da variação total) e efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) nos teores de 5-metilfurfural (10,5% da variação total) e furfural (3,4% da variação total).

As concentrações de ácido acético diminuíram e os teores de furfural, 5-metilfurfural e HMF tiveram tendência em aumentar ao longo do tempo. Os resultados obtidos estão de acordo com o verificado por Wang *et al.* (2018) para a evolução em garrafa de bebida fermentada de frutos vermelhos. Revi *et al.* (2014) e Wu *et al.* (2011) verificaram, respectivamente, em vinho branco e em bebida fermentada de lichia o aumento dos teores de furfural ao longo do tempo de conservação em garrafa, enquanto que outros estudos apontam uma tendência contrária em vinhos tintos (Liu *et al.*, 2016). Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, o ácido acético mostrou tendência para aumentar em vinhos brancos conservados em garrafa (Revi *et al.*, 2014).

1.4 Ésteres e compostos terpénicos

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) obtidos para a quantificação dos ésteres (isobutirato de etilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo) e composto terpénico (linalol) nas aguardentes em estudo.

Tabela 9: Resultado da ANOVA dos ésteres e compostos terpênicos (média e desvio padrão).

Code		isobutirato de etilo	acetato de isobutilo	butirato de etilo	acetato de isoamilo	hexanoato de etilo	octanoato de etilo	linalol	
G6	Castanho	B	0,93±0,22 b	1,81±0,30 c	0,84±0,02 b	2,63±0,08 b	1,89±0,04 c	2,20±0,03 b	0,14±0,00 a
		15	0,64±0,22 b	0,55±0,29 a	0,73±0,16 b	2,26±0,24 ab	1,72±0,03 cd	2,23±0,49 b	0,17±0,03 ab
		30	0,66±0,02 b	0,00±0,00 a	0,85±0,04 b	2,35±0,00 ab	1,72±0,06 cd	1,88±0,19 b	0,25±0,03 b
		60	0,71±0,00 b	0,00±0,00 a	0,86±0,01 b	2,44±0,04 ab	1,80±0,06 cd	2,07±0,31 b	0,25±0,03 c
		N	0,58±0,08 b	1,34±0,36 c	0,72±0,09 b	2,27±0,06 ab	1,58±0,04 bc	1,93±0,55 b	0,16±0,00 b
	Carvalho	B	0,45±0,06 a	0,93±0,45 b	0,67±0,06 a	2,30±0,15 ab	1,67±0,02 bc	2,01±0,02 a	0,18±0,01 a
		15	0,49±0,01 a	0,42±0,09 a	0,72±0,06 a	2,24±0,06 ab	1,48±0,06 b	1,73±0,07 a	0,21±0,03 ab
		30	0,53±0,08 a	0,47±0,02 a	0,73±0,01 a	2,31±0,01 ab	1,48±0,08 b	1,55±0,48 a	0,18±0,00 b
		60	0,47±0,02 a	0,00±0,00 a	0,78±0,03 a	2,29±0,09 ab	1,54±0,02 b	1,85±0,26 a	0,28±0,03 c
		N	0,42±0,00 a	0,00±0,00 a	0,71±0,01 a	2,22±0,13 ab	1,49±0,02 b	1,57±0,03 a	0,29±0,02 b
G6	Castanho	B	0,82±0,06 c	1,12±0,08 c	0,76±0,07 b	2,14±0,15 ab	1,73±0,33 cd	3,76±0,60 d	0,32±0,04 d
		15	0,83±0,04 c	0,00±0,00 a	0,78±0,01 b	2,12±0,01 ab	1,62±0,00 bc	3,67±0,02 d	0,31±0,00 d
		30	0,77±0,02 c	0,00±0,00 a	0,75±0,00 b	1,90±0,17 a	1,53±0,04 b	2,64±0,11 d	0,31±0,00 cd
		60	0,78±0,00 c	0,00±0,00 a	0,79±0,01 b	2,11±0,01 ab	1,59±0,03 bc	3,68±0,10 d	0,30±0,01 cd
		N	0,73±0,03 c	1,54±0,14 c	0,75±0,06 b	2,10±0,05 ab	1,63±0,03 bc	3,10±0,24 d	0,33±0,01 d
	Carvalho	B	0,58±0,02 a	1,21±0,18 b	0,75±0,03 a	2,08±0,09 ab	1,45±0,03 ab	2,90±0,22 c	0,32±0,00 d
		15	0,50±0,01 a	0,00±0,00 a	0,68±0,01 a	2,08±0,05 ab	1,32±0,06 a	2,56±0,07 c	0,31±0,00 d
		30	0,51±0,00 a	0,00±0,00 a	0,71±0,01 a	2,04±0,03 ab	1,28±0,07 a	2,50±0,02 c	0,30±0,01 cd
		60	0,51±0,02 a	0,00±0,00 a	0,70±0,00 a	2,07±0,02 ab	1,31±0,03 a	2,59±0,14 c	0,31±0,01 cd
		N	0,49±0,01 a	0,00±0,00 a	0,70±0,00 a	2,08±0,01 ab	1,31±0,03 a	2,28±0,18 c	0,32±0,00 d
Tempo [T]	4,4*	1,9*	n.s.	72,8***	23,3***	63,0***	70,9***		
Madeira [W]	77,5***	9,1***	41,9***	3,3*	55,8***	17,1***	n.s.		
Modalidade [M]	n.s.	45,8***	n.s.	4,5*	8,7***	5,5**	4,3**		
TxW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5,6*	n.s.*		
TxM	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15,0**		
WxM	n.s.	35,0***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
Erro	18,1	8,2	58,1	19,3	12,2	8,7	9,8		

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

1.4.1. Efeito da madeira

O teor da maioria dos compostos foi significativamente influenciado pelo fator madeira. No entanto, os teores de linalol não foram significativamente influenciados pela madeira. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores do isobutirato de etilo (77,5% da variação total), acetato de isobutilo (9,1% da variação total), butirato de etilo (41,9% da variação total), hexanoato de etilo (55,8% da variação total) e octanoato de etilo (17,1% da variação total) e efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no teor de acetato de isoamilo (3,3% da variação total). Para os compostos isobutirato de etilo, butirato de etilo e hexanoato de etilo verifica-se que o efeito da madeira é o que mais contribui para a explicação da variabilidade total observada.

Os teores dos compostos isobutirato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo e acetato de isoamilo foram encontrados em maiores quantidades nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Nos trabalhos de Caldeira *et al.* (2010) e Granja-Soares *et al.* (2020), os teores destes compostos, com exceção de isobutirato de etilo e acetato de isoamilo, foram significativamente influenciados pelo tipo de madeira utilizada e as maiores quantidades destes compostos foram encontradas nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Assim, os resultados obtidos estão de acordo com o verificado anteriormente. As concentrações de acetato de isobutilo foram superiores nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro analisadas logo após o ano de envelhecimento (G0), mas nas aguardentes analisadas após 6 meses em garrafa (G6) apresentaram maiores concentrações nas que foram envelhecidas em madeira de carvalho.

1.4.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação tiveram um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de acetato de isobutilo (45,28 da variação total) e hexanoato de etilo (8,7% da variação total), e muito significativo ($\alpha < 0,01$) nos teores de octanoato de etilo (5,5% da variação total) e linalol (4,3% da variação total). Verificou-se ainda um baixo efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no teor de acetato de isoamilo (4,5% da variação total). Os teores dos restantes compostos não foram significativamente influenciados. Para o acetato de isobutilo, verifica-se que o efeito da modalidade de oxigenação é o que mais contribui para explicar a variabilidade total. Para o hexanoato de etilo, octanoato de etilo e acetato de isobutilo, as concentrações mais elevadas foram encontradas nas aguardentes

oriundas das vasilhas (sistema de envelhecimento tradicional). Os teores elevados de acetato de isobutilo em aguardentes envelhecidas em vasilhas estão de acordo com alguns estudos (Caldeira *et al.*, 2010, 2016), mas não vão de encontro aos resultados de Granja-Soares *et al.* (2020).

As concentrações de acetato de isobutilo podem dever-se à existência de ácido acético na aguardente, o que contribui para a elevada concentração deste éster através de reações de oxidação e esterificação (Caldeira *et al.*, 2016).

1.4.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

O teor da maioria dos compostos foi significativamente influenciado pelo fator tempo, apenas os teores de butirato de etilo não foram significativamente influenciados pelo tempo. Assim, o tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nos teores de acetato de isoamilo (72,8% da variação total), hexanoato de etilo (23,3% da variação total), octanoato de etilo (63,0% da variação total) e linalol (70,9% da variação total), e um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) nos teores de isobutirato de etilo (4,4% da variação total) e acetato de isobutilo (1,9% da variação total). Para o acetato de isoamilo, octanoato de etilo e linalol verifica-se que o efeito do tempo é o parâmetro que mais contribui e que pode explicar a variabilidade total observada.

Verificou-se que as concentrações de octanoato de etilo e linalol aumentam ao longo do tempo. O aumento observado no presente estudo não está de acordo com os resultados de Wang *et al.* (2018) em bebida fermentada de frutos vermelhos. No caso das concentrações de linalol estes resultados estão de acordo com alguns estudos em vinhos tintos e fermentados de líchia (Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2011) mas em desacordo com os resultados de Revi *et al.* (2014) em vinho branco.

Os teores de isobutirato de etilo têm igualmente tendência a aumentar, apesar de existir uma diminuição nas aguardentes envelhecidas em vasilha feita com madeira de castanheiro e nas produzidas em madeira de carvalho pela modalidade de 30 dias de oxigenação.

O acetato de isobutilo tem um comportamento que difere dependendo da madeira em análise. Quando se trata do envelhecimento em castanheiro a tendência é que as concentrações aumentam ao longo do tempo na modalidade de azoto e diminuem no uso da vasilha ou da modalidade de oxigenação de 15 dias. No entanto, quando se analisa as

aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho, torna-se difícil elucidar conclusões que permitam relacionar todas as aguardentes em função do tempo.

Os valores de concentração do acetato de isoamilo decrescem com o aumento do tempo em garrafa e os de hexanoato de etilo também têm tendência a decrescer, apenas aumentando nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro na modalidade de azoto. Os resultados obtidos para o acetato de isoamilo estão de acordo com alguns estudos (Revi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018) mas encontram-se em desacordo aos publicados por Liu *et al.* (2016). Para vários autores (Revi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011), os teores de hexanoato de etilo também têm tendência a diminuir. No entanto existem estudos que indicam uma tendência contrária (Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

1.5 Ácidos e Álcoois

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) obtidos para a quantificação dos ácidos (butanóico, isovalérico, hexanóico e dodecanóico) e álcoois (*trans*-2-hexenol e 2-feniletanol) nas aguardentes em estudo.

Tabela 10: Resultados da ANOVA dos ácidos e álcoois (média e desvio padrão).

Code		trans-2-hexenol	ácido butanóico	ácido isovalérico	ácido hexanóico	2-feniletanol	ácido dodecanóico	
G0	Castanho	B	0,55±0,01	0,83±0,00 a	2,20±0,18 b	2,25±0,08 b	9,53±0,24 c	0,70±0,03 b
		15	0,51±0,03	0,75±0,12 a	1,78±0,36 b	2,25±0,35 b	9,69±0,60 c	0,65±0,06 b
		30	0,52±0,01	0,84±0,06 a	1,05±0,05 b	2,59±0,10 b	9,37±0,12 c	0,64±0,07 b
		60	0,55±0,03	0,89±0,08 a	1,01±0,10 b	2,49±0,12 b	9,06±0,67 bc	0,70±0,00 b
		N	0,49±0,01	0,86±0,14 a	1,99±0,75 b	2,42±0,02 b	8,72±0,42 ab	0,58±0,02 b
	Carvalho	B	0,49±0,00	0,68±0,08 b	1,57±0,20 b	2,59±0,10 c	8,91±0,07 c	0,71±0,01 c
		15	0,57±0,00	0,97±0,06 b	1,34±0,25 b	2,62±0,14 c	9,12±0,21 c	0,73±0,06 c
		30	0,51±0,00	0,98±0,04 b	2,07±0,10 b	2,84±0,23 c	9,27±0,08 c	0,91±0,24 c
		60	0,56±0,02	1,01±0,03 b	1,10±0,03 b	2,75±0,03 c	9,19±0,00 bc	0,72±0,04 c
		N	0,58±0,00	0,91±0,12 b	1,09±0,05 b	2,83±0,03 c	8,77±0,24 ab	0,63±0,02 c
G6	Castanho	B	0,53±0,04	0,98±0,08 a	1,35±0,12 a	2,37±0,15 a	9,95±0,15 c	0,66±0,04 a
		15	0,50±0,00	0,78±0,22 a	1,19±0,07 a	2,11±0,07 a	8,53±0,24 a	0,54±0,02 a
		30	0,53±0,02	0,69±0,00 a	1,25±0,04 a	2,14±0,06 a	8,59±0,13 a	0,49±0,05 a
		60	0,52±0,01	0,59±0,01 a	1,25±0,01 a	2,11±0,04 a	8,53±0,03 a	0,57±0,01 a
		N	0,54±0,02	0,67±0,03 a	1,30±0,01 a	2,26±0,03 a	8,89±0,06 ab	0,59±0,04 a
	Carvalho	B	0,53±0,01	0,66±0,01 b	1,29±0,08 a	2,43±0,11 b	8,91±0,13 c	0,68±0,04 ab
		15	0,52±0,01	0,96±0,01 b	1,22±0,03 a	2,37±0,03 b	8,76±0,19 a	0,60±0,01 ab
		30	0,51±0,02	1,16±0,38 b	1,25±0,23 a	2,22±0,07 b	8,09±0,28 a	0,68±0,18 ab
		60	0,54±0,00	0,92±0,04 b	1,25±0,09 a	2,31±0,12 b	8,45±0,51 a	0,56±0,01 ab
		N	0,52±0,00	0,97±0,11 b	1,31±0,13 a	2,45±0,17 b	8,51±0,13 ab	0,55±0,01 ab
Tempo [T]		n.s.	n.s.	24,3*	50,3***	24,9***	43,1***	
Madeira [W]		n.s.	34,1**	n.s.	35,2***	9,9**	15,4**	
Modalidade [M]		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	12,5**	n.s.	
TxW		n.s.	n.s.	n.s.	7,2*	n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	27,7**	n.s.	
WxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Erro			65,9	75,7	7,4	25,0	41,4	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

1.5.1. Efeito da madeira

O teor da maioria dos compostos foi significativamente influenciado pelo fator madeira, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes compostos. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) no teor do ácido hexanóico (35,2% da variação total), muito significativo ($\alpha < 0,01$) nos teores do ácido butanóico (34,1% da variação total), 2-feniletanol (9,9% da variação total) e ácido dodecanóico (15,4% da variação total) e não apresentou influência significativa no teor de *trans*-2-hexenol e ácido isovalérico. Para o ácido butanóico verifica-se que este parâmetro é o principal fator e que permite explicar a variabilidade total observada.

As concentrações de ácido butanóico foram maioritariamente mais elevadas nas aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho. No entanto, quando o envelhecimento foi realizado em vasilhas de madeira de castanheiro, este composto apresentou maiores concentrações. O estudo de Caldeira *et al.* (2010) apresentou também resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

As aguardentes envelhecidas em contato com a madeira de carvalho apresentaram maiores concentrações de ácido hexanóico e em ácido dodecanóico. No entanto para este último a diferença entre as aguardentes das duas madeiras, atenuou-se ao fim do período de 6 meses de conservação em garrafa.

Na maioria das aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro o teor de 2-feniletanol foi superior.

1.5.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação tiveram um efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) apenas no teor do 2-feniletanol (12,5% da variação total). Os teores dos restantes compostos não foram significativamente influenciados pelas condições de oxigenação, sendo o fator que menos contribui para a explicação da variabilidade total observada.

1.5.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

Com exceção dos teores dos compostos *trans*-2-hexenol e ácido butanóico, que não foram significativamente influenciados pelo fator tempo, todos os restantes compostos apresentaram teores significativamente influenciados por este fator. Assim, o tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) no teor do ácido hexanóico (50,3% da variação total), 2-feniletanol (24,9% da variação total) e ácido dodecanóico (43,1% da variação total) e um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no teor do ácido isovalérico (24,3% da variação total). Verificou-se ainda que, com exceção dos compostos *trans*-2-hexenol e ácido butanóico, este é o principal efeito que permite explicar a variação observada.

As concentrações dos compostos significativamente influenciados pelo fator tempo, tiveram tendência em diminuir ao longo do tempo. Contudo, apesar da tendência ser de diminuição, existiu, ao longo do tempo, um aumento no teor dos compostos em algumas das modalidades. Esta tendência é comum á encontrada em outras publicações com bebidas fermentadas (Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). No entanto, no estudo de Revi *et al.* (2014) os resultados obtidos em vinho branco foram contrários aos aqui apresentados.

2. Análise sensorial

A análise sensorial descritiva quantitativa foi realizada com recurso à ficha de prova desenvolvida em Caldeira *et al.*, (1999). Esta ficha de prova (Anexo I) é composta por 34 descritores avaliados numa escala de 0-5 (5 descritores de cor, 17 descritores de aroma, 12 descritores de sabor) e 3 descritores avaliados numa escala de 1-20 (apreciações de aroma, sabor e geral).

2.1 Descritores de cor

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) realizados aos resultados dos descritores de cor (citrino, palha, dourado, topázio e esverdeado) nas aguardentes em estudo.

Tabela 11: Resultados da ANOVA dos descritores de cor (média e desvio padrão).

Code		citrino	palha	dourado	topázio	esverdeado	
G0	Castanho	B	0,00±0,00 a	0,50±0,10 b	0,93±0,10 a	3,00±0,00 c	1,36±0,10 d
		15	0,00±0,00 a	0,43±0,00 b	1,50±0,51 ab	2,71±0,40 c	1,36±0,10 d
		30	0,21±0,30 a	0,86±0,40 b	0,93±0,30 abc	2,07±1,11 b	0,93±0,51 c
		60	0,00±0,00 a	0,50±0,10 b	1,57±0,00 a	2,29±0,20 c	1,36±0,30 d
		N	0,00±0,00 a	0,82±0,45 b	1,54±0,25 cd	1,96±1,16 b	0,89±0,45 c
	Carvalho	B	0,86±0,00 b	2,07±0,10 d	2,57±0,40 e	0,14±0,20 a	0,21±0,10 ab
		15	1,14±0,00 b	2,21±0,10 d	1,79±0,30 cd	0,00±0,00 a	0,21±0,10 a
		30	0,57±0,20 b	2,86±0,81 d	1,14±0,61 a	0,00±0,00 a	0,43±0,20 ab
		60	0,79±0,30 b	2,32±0,05 d	2,11±0,15 de	0,00±0,00 a	0,29±0,00 ab
		N	0,57±0,20 b	2,64±0,71 d	1,21±0,51 bcd	0,36±0,51 a	0,50±0,10 b
G6	Castanho	B	0,18±0,07 a	0,20±0,07 a	1,00±0,12 a	3,70±0,21 c	1,57±0,12 d
		15	0,14±0,00 a	0,29±0,12 a	1,11±0,36 ab	3,57±0,78 c	1,46±0,07 d
		30	0,14±0,00 a	0,32±0,07 a	1,52±0,65 abc	2,57±1,02 b	1,14±0,33 c
		60	0,18±0,07 a	0,29±0,00 a	1,00±0,12 a	3,36±0,50 c	1,46±0,07 d
		N	0,25±0,07 a	0,36±0,08 a	1,98±0,40 cd	1,88±0,36 b	0,93±0,34 c
	Carvalho	B	0,68±0,32 b	1,93±0,27 c	2,25±0,58 e	0,32±0,32 a	0,39±0,07 ab
		15	1,11±0,38 b	2,21±0,18 c	1,75±0,38 cd	0,11±0,07 a	0,32±0,07 a
		30	1,00±0,31 b	2,07±0,54 c	1,18±0,54 a	0,11±0,14 a	0,32±0,07 ab
		60	0,75±0,32 b	2,09±0,64 c	2,11±0,54 de	0,13±0,17 a	0,36±0,08 ab
		N	0,89±0,58 b	2,11±0,24 c	1,96±0,64 bcd	0,21±0,25 a	0,54±0,07 b
Tempo [T]		n.s.	2,7***	n.s.	1,1*	n.s.	
Madeira [W]		85,3***	93,4***	26,4***	88,3***	83,4***	
Modalidade [M]		n.s.	n.s.	5,5*	2,0**	1,2*	
TxW		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
WxM		n.s.	n.s.	40,2***	4,7***	10,6***	
Erro		14,7	3,8	27,9	3,9	4,7	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.1.1. Efeito da madeira

A madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) em todos os descritores de cor, verificando-se que para todos os atributos de cor, o efeito da madeira é o principal fator que permite explicar a variação observada.

Os descritores da cor citrino (85,3% da variação total), palha (93,4% da variação total) e dourado (26,4% da variação total) apresentam maior intensidade nas aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho, enquanto os descritores topázio (88,3% da variação total) e esverdeado (83,4% da variação total) apresentam maior intensidade nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Caldeira *et al.*, 2013; Granja-Soares *et al.*, 2020).

As cores topázio e esverdeado são as principais cores das aguardentes envelhecidas. Assim, as aguardentes envelhecidas em castanheiro parecem ter uma cor mais evoluída e conseqüentemente possuem características de maior envelhecimento. Este facto poderá ser explicado pela maior porosidade da madeira de castanheiro (De Rosso *et al.*, 2009) que contribuirá para uma maior transferência de oxigénio, promovendo os processos de extração e oxidação dos compostos extraíveis desta madeira que irão influenciar a cor (Canas *et al.*, 2019b).

2.1.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As intensidades dos descritores de cor foram significativamente influenciadas pelas condições de oxigenação, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes descritores. Assim, as condições de oxigenação tiveram um efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) na intensidade do descritor topázio (2,0% da variação total) e um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) nos descritores dourado (5,5% da variação total) e esverdeado (1,2% da variação total). Este fator não teve efeito significativo nos descritores citrino e palha.

2.1.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

O tempo de conservação em garrafa não teve efeito significativo na intensidade dos descritores citrino, dourado e esverdeado. No entanto, teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) na intensidade do descritor palha (2,7% da variação total) e um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no descritor topázio (1,1% da variação total).

A intensidade do descritor palha teve tendência a diminuir ao longo do tempo enquanto a intensidade do descritor topázio teve tendência a aumentar.

2.2 Descritores de aroma

Nas tabelas 12 e 13 apresentam-se as sínteses da ANOVA e do teste de comparação de médias (Fisher) realizados aos resultados dos descritores de aroma (álcool, frutado, floral, baunilha, madeira, ranço bom, especiarias, caramelo, torrado/queimado, frutos secos, fumo/cinzas, café, adocicado, herbáceo, caudas, cola/verniz e borracha) nas aguardentes em estudo.

Tabela 12: Resultados da ANOVA dos descritores de aroma (média e desvio padrão).

Code		Álcool	frutado	floral	baunilha	Madeira	ranço bom	Especiarias	caramelo	
G6	Castanho	B	1,93±0,10 b	1,50±0,10	1,00±0,00 a	1,43±0,00 ab	2,07±0,10 b	0,57±0,00 b	1,43±0,20 b	1,79±0,10 b
		15	1,86±0,20 a	1,43±0,20	1,07±0,30 a	2,14±0,00 b	1,93±0,10 b	0,86±0,20 b	1,79±0,10 b	1,79±0,10 b
		30	2,50±0,30 b	1,64±0,10	0,79±0,10 a	1,43±0,00 a	1,86±0,61 b	0,50±0,10 b	1,64±0,30 b	1,64±0,10 b
		60	2,36±0,10 b	1,36±0,30	1,07±0,30 a	2,36±0,30 b	2,21±0,10 b	0,57±0,20 b	1,93±0,30 b	1,86±0,40 b
		N	2,29±0,20 b	1,57±0,00	1,04±0,05 a	1,71±0,00 ab	1,96±0,25 b	0,71±0,20 b	1,43±0,20 b	1,82±0,05 b
	Carvalho	B	2,79±0,10 b	1,57±0,20	0,93±0,10 a	2,07±0,10 a	1,86±0,20 a	0,71±0,00 a	1,29±0,40 a	1,00±0,00 a
		15	2,14±0,20 a	1,36±0,10	1,07±0,30 a	1,64±0,30 ab	1,79±0,10 a	0,29±0,00 a	1,36±0,10 a	1,00±0,20 a
		30	2,43±0,40 b	1,21±0,51	1,14±0,00 a	1,43±0,40 a	1,79±0,10 a	0,50±0,10 a	1,07±0,30 a	1,21±0,30 a
		60	2,36±0,10 b	1,39±0,25	1,25±0,05 a	1,64±0,10 ab	1,64±0,10 a	0,46±0,05 a	1,25±0,05 a	1,11±0,15 a
		N	2,57±0,20 b	1,64±0,30	1,14±0,20 a	1,57±0,20 a	1,50±0,10 a	0,71±0,00 a	1,07±0,10 a	1,21±0,51 a
G6	Castanho	B	2,11±0,14 ab	1,45±0,24	1,25±0,07 b	1,93±0,44 ab	2,34±0,07 c	0,75±0,14 b	1,84±0,28 b	1,82±0,21 b
		15	2,11±0,24 ab	1,50±0,25	1,43±0,39 b	2,04±0,24 b	2,43±0,35 c	0,79±0,18 b	1,86±0,31 b	1,96±0,24 b
		30	1,95±0,26 a	1,55±0,12	1,32±0,24 b	1,70±0,39 a	2,20±0,33 c	0,63±0,24 b	1,82±0,32 b	1,75±0,38 b
		60	2,04±0,24 a	1,43±0,12	1,25±0,24 b	1,96±0,18 b	2,43±0,33 c	0,71±0,12 b	1,61±0,18 b	1,86±0,16 b
		N	2,13±0,09 ab	1,71±0,29	1,36±0,27 b	2,00±0,20 ab	2,09±0,31 c	0,70±0,31 b	1,75±0,66 b	2,04±0,51 b
	Carvalho	B	2,39±0,24 ab	1,57±0,42	1,04±0,18 a	1,46±0,38 a	1,82±0,27 b	0,46±0,18 a	1,14±0,26 a	0,82±0,32 a
		15	2,39±0,32 ab	1,54±0,14	1,11±0,29 a	1,86±0,12 ab	2,07±0,08 b	0,39±0,14 a	1,29±0,16 a	0,96±0,32 a
		30	2,18±0,18 a	1,63±0,38	1,00±0,12 a	1,61±0,39 a	1,93±0,44 b	0,39±0,07 a	1,61±0,56 a	1,13±0,42 a
		60	2,13±0,19 a	1,54±0,29	1,21±0,18 a	2,00±0,39 ab	2,23±0,16 b	0,38±0,14 a	1,54±0,18 a	1,21±0,14 a
		N	2,29±0,12 ab	1,71±0,20	1,32±0,29 a	1,64±0,18 a	2,14±0,48 b	0,46±0,18 a	1,54±0,14 a	0,96±0,18 a
Tempo [T]		10,2*	n.s.	18,6**	n.s.	29,9***	n.s.	n.s.	n.s.	
Madeira [W]		29,5***	n.s.	n.s.	13,8*	25,5***	57,8***	49,1***	85,3***	
Modalidade [M]		n.s.	n.s.	n.s.	18,3*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxW		n.s.	n.s.	29,8*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxM		22,9*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
WxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Erro		37,4		51,6	67,9	44,6	57,8	50,9	14,7	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

Tabela 13: Resultados da ANOVA dos descritores de aroma (média e desvio padrão) (continuação).

Code		torrado/ queimado	frutos secos	fumo/cinzas	café	adocicado	herbáceo	caudas	cola/verniz	borracha	
G6	Castanho	B	1,57±0,20 b	1,64±0,10 a	1,29±0,20 b	0,86±0,00 b	1,79±0,71 b	0,21±0,30	0,00±0,00 a	0,07±0,10 a	0,00±0,00
		15	1,64±0,10 b	1,93±0,10 a	1,36±0,51 b	0,93±0,51 b	2,00±0,20 b	0,29±0,20	0,00±0,00 a	0,07±0,10 a	0,07±0,10
		30	1,50±0,30 b	1,50±0,51 a	1,36±0,71 b	0,71±0,40 b	1,64±0,30 b	0,64±0,10	0,00±0,00 a	0,07±0,10 a	0,14±0,00
		60	1,50±0,30 b	1,93±0,30 a	1,07±0,10 b	0,79±0,30 b	1,57±0,00 b	0,29±0,00	0,07±0,10 a	0,07±0,10 a	0,00±0,00
		N	1,50±0,30 b	1,43±0,20 a	1,18±0,35 b	0,96±0,56 b	1,46±0,25 b	0,61±0,15	0,25±0,15 b	0,07±0,10 a	0,07±0,10
	Carvalho	B	1,36±0,30 a	1,64±0,10 a	1,14±0,40 a	0,29±0,00 a	1,71±0,40 bc	0,36±0,10	0,14±0,20 a	0,39±0,15 b	0,00±0,00
		15	1,29±0,20 a	1,79±0,10 a	1,07±0,10 a	0,36±0,10 a	2,00±0,61 bc	0,29±0,20	0,00±0,00 a	0,14±0,20 b	0,21±0,30
		30	1,00±0,40 a	1,29±0,00 a	0,93±0,71 a	0,36±0,30 a	1,64±0,10 bc	0,50±0,10	0,07±0,10 a	0,14±0,00 b	0,00±0,00
		60	1,29±0,00 a	1,61±0,05 a	1,18±0,05 a	0,68±0,05 a	1,93±0,10 bc	0,14±0,00	0,00±0,00 a	0,11±0,15 b	0,00±0,00
		N	1,21±0,10 a	1,21±0,10 a	1,21±0,10 a	0,57±0,00 a	2,00±0,40 bc	0,36±0,10	0,14±0,20 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00
G6	Castanho	B	1,61±0,41 b	2,05±0,44 b	1,43±0,12 b	0,88±0,26 b	2,00±0,42 c	0,45±0,12	0,05±0,07 a	0,04±0,07 a	0,04±0,07
		15	1,89±0,39 b	2,32±0,38 b	1,43±0,35 b	1,25±0,43 b	2,07±0,25 c	0,32±0,21	0,00±0,00 a	0,18±0,07 a	0,00±0,00
		30	1,70±0,24 b	2,02±0,22 b	1,29±0,12 b	0,95±0,47 b	2,04±0,14 c	0,41±0,09	0,00±0,00 a	0,09±0,18 a	0,02±0,04
		60	1,54±0,21 b	1,71±0,29 b	1,54±0,18 b	0,82±0,14 b	2,07±0,25 c	0,43±0,20	0,00±0,00 a	0,04±0,07 a	0,04±0,07
		N	1,61±0,29 b	1,80±0,46 b	1,36±0,18 b	0,70±0,31 b	1,88±0,19 c	0,52±0,33	0,00±0,00 a	0,05±0,07 a	0,11±0,21
	Carvalho	B	1,04±0,27 a	1,71±0,16 a	0,86±0,35 a	0,11±0,07 a	1,14±0,20 a	0,25±0,07	0,07±0,08 a	0,25±0,07 b	0,04±0,07
		15	1,32±0,14 a	1,43±0,12 a	0,96±0,14 a	0,29±0,00 a	1,21±0,18 a	0,18±0,07	0,00±0,00 a	0,18±0,14 b	0,00±0,00
		30	1,07±0,47 a	1,75±0,50 a	0,98±0,47 a	0,18±0,14 a	1,48±0,20 a	0,23±0,18	0,00±0,00 a	0,25±0,29 b	0,04±0,07
		60	1,36±0,18 a	1,82±0,07 a	0,96±0,22 a	0,32±0,14 a	1,61±0,34 a	0,20±0,07	0,04±0,07 a	0,16±0,15 b	0,00±0,00
		N	1,39±0,14 a	1,68±0,29 a	1,21±0,49 a	0,43±0,39 a	1,57±0,16 a	0,36±0,14	0,00±0,00 a	0,14±0,20 b	0,00±0,00
Tempo [T]		n.s.	18,4**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16,4**	n.s.	n.s.	
Madeira [W]		59,5***	27,1**	41,9***	75,5***	24,4***	n.s.	n.s.	28,4**	n.s.	
Modalidade [M]		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxW		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	55,0***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	34,9**	n.s.	n.s.	
WxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Erro		40,5	54,5	58,1	24,5	20,6		48,7	71,6		

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.2.1. Efeito da madeira

As intensidades dos descritores de aroma foram significativamente influenciadas pela madeira, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes descritores. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) na intensidade dos descritores álcool (29,5% da variação total), madeira (25,5% da variação total), ranço bom (57,8% da variação total), especiarias (49,1% da variação total), caramelo (85,3% da variação total), torrado/queimado (59,5% da variação total), fumo/cinzas (41,9% da variação total), café (75,5% da variação total) e adocicado (24,4% da variação total). Um efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) na intensidade dos descritores frutos secos (27,1% da variação total) e cola/verniz (28,4% da variação total) e apenas um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) no descritor baunilha (13,8% da variação total). Este fator não teve efeito significativo nos descritores frutado, floral, herbáceo, caudas e borracha. Verificou-se que, com exceção dos descritores frutado, floral, baunilha, madeira, herbáceo, caudas e borracha, este é o principal efeito que permite explicar a variação observada.

Os descritores álcool e cola/verniz apresentam maior intensidade nas aguardentes envelhecidas em madeira de carvalho e os descritores madeira, especiarias, caramelo, torrado/queimado, frutos secos, fumo/cinzas e café apresentam maior intensidade nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados dos descritores obtidos noutros estudos (Caldeira *et al.*, 2010; Granja-Soares *et al.*, 2020).

As maiores intensidades de ranço bom e adocicado apresentam-se nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro após 6 meses de envelhecimento em garrafa (G6) (em Go as intensidades são muito idênticas entre madeiras).

Alguns destes descritores estão associados a compostos voláteis odorantes (Caldeira *et al.*, 2008, 2010), como por exemplo: caramelo, torrado/queimado, frutos secos (aldeídos furânicos); fumo/cinzas (fenóis voláteis). As aguardentes envelhecidas em castanheiro parecem ter mais tempo de envelhecimento, comparando com as de carvalho, devido a estes descritores apresentarem uma maior intensidade. Este facto pode ser explicado devido a este tipo de madeira ser mais poroso (De Rosso *et al.*, 2009) tendo maior capacidade de extração/oxidação de compostos odorantes.

2.2.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As intensidades da maioria dos descritores de aroma não foram significativamente influenciadas pelas condições de oxigenação. Este fator teve apenas efeito significativo ($\alpha < 0,05$) na intensidade do descritor baunilha (18,3% da variação total), sendo o fator que menos contribuiu para a explicação da variabilidade total observada.

2.2.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

As intensidades dos descritores de aroma foram significativamente influenciadas pelo tempo, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes descritores. Assim, o tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) na intensidade do descritor madeira (29,9% da variação total), muito significativo ($\alpha < 0,01$) na intensidade dos descritores floral (18,6% da variação total), frutos secos (18,4% da variação total) e caudas (16,4% da variação total) e apenas significativo ($\alpha < 0,05$) no descritor álcool (10,2% da variação total). Este fator não teve efeito significativo nos restantes descritores de aroma.

A intensidade dos descritores álcool e caudas têm tendência em diminuir ao longo do tempo enquanto a intensidade dos descritores floral, madeira e frutos secos têm tendência em aumentar.

2.3 Descritores de sabor

Nas Tabelas 14 e 15 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) realizados aos resultados dos descritores de sabor (doce, macio, queimante, adstringência, aspereza, amargo, corpo, untuosidade, evolução, complexidade, aroma de boca e persistência) nas aguardentes em estudo.

Tabela 14: Resultados da ANOVA dos descritores de sabor (média e desvio padrão).

Code		doce	macio	queimante	adstringência	aspereza	amargo	
G0	Castanho	B	2,79±0,71 c	2,86±0,20 b	1,93±0,30	2,07±0,10 b	1,71±0,20	1,50±0,30 a
		15	2,71±0,00 c	2,93±0,10 ab	1,93±0,10	1,86±0,20 b	1,71±0,00	1,36±0,10 a
		30	2,64±0,10 c	2,57±0,20 a	2,50±0,10	1,79±0,30 b	1,64±0,10	1,64±0,10 a
		60	2,64±0,10 c	2,64±0,10 ab	2,43±0,20	1,71±0,20 b	1,86±0,20	1,43±0,00 a
		N	2,96±0,35 c	3,07±0,10 ab	1,89±0,05	1,71±0,20 b	1,39±0,35	1,36±0,10 a
	Carvalho	B	2,50±0,30 b	2,57±0,20 a	2,79±0,10	1,93±0,10 b	2,00±0,40	1,71±0,00 a
		15	2,43±0,20 b	2,79±0,30 a	2,64±0,51	1,71±0,00 b	2,00±0,00	1,36±0,10 a
		30	2,43±0,20 b	3,14±0,20 ab	2,14±0,20	1,93±0,10 b	1,71±0,00	1,57±0,20 a
		60	2,50±0,10 b	2,93±0,10 ab	2,36±0,30	1,93±0,10 b	2,00±0,20	1,54±0,05 a
		N	2,57±0,20 b	2,86±0,61 ab	2,43±0,81	1,79±0,10 b	1,79±0,10	1,43±0,00 a
G6	Castanho	B	2,07±0,08 a	3,04±0,21 b	2,23±0,24	1,88±0,33 a	2,11±0,21	1,80±0,16 b
		15	2,00±0,26 a	2,89±0,07 ab	2,54±0,32	1,86±0,16 a	2,39±0,32	1,86±0,20 b
		30	2,18±0,21 a	2,63±0,26 a	2,38±0,33	1,70±0,09 a	2,34±0,14	1,93±0,30 b
		60	1,93±0,34 a	2,79±0,08 ab	2,36±0,14	1,79±0,14 a	2,29±0,12	1,93±0,43 b
		N	1,95±0,21 a	2,79±0,18 ab	2,29±0,37	1,48±0,27 a	2,00±0,26	1,71±0,12 b
	Carvalho	B	2,29±0,23 a	2,71±0,12 a	2,29±0,33	1,64±0,18 a	2,00±0,37	1,82±0,41 b
		15	1,93±0,14 a	2,61±0,27 a	2,50±0,27	1,64±0,34 a	2,14±0,31	1,71±0,23 b
		30	2,05±0,40 a	2,75±0,49 ab	2,36±0,14	1,48±0,24 a	1,86±0,31	1,79±0,18 b
		60	1,96±0,29 a	2,89±0,24 ab	2,59±0,19	1,63±0,14 a	2,04±0,14	1,54±0,14 b
		N	2,04±0,21 a	2,75±0,24 ab	2,32±0,21	1,71±0,20 a	1,96±0,32	1,93±0,25 b
Tempo [T]		69,9***	n.s.	n.s.	26,1**	n.s.	53,5***	
Madeira [W]		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Modalidade [M]		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxW		9,1*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
TxM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
WxM		n.s.	36,0*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Erro		21,0	36,0		73,9		46,5	

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

Tabela 15: Resultados da ANOVA dos descritores de sabor (média e desvio padrão) (continuação).

Code		corpo	untuosidade	evolução	complexidade	aroma de boca	persistência	
G ₀	Castanho	B	2,93±0,30 c	2,64±0,10 b	3,14±0,40 b	3,07±0,30 bc	3,21±0,30	3,29±0,00 bc
		15	3,00±0,20 c	2,64±0,10 b	3,14±0,40 b	3,07±0,10 bc	3,21±0,30	3,14±0,20 bc
		30	2,71±0,00 ab	2,07±0,30 b	2,64±0,51 b	2,57±0,40 ab	2,93±0,51	2,93±0,71 ab
		60	3,07±0,30 bc	3,07±0,10 b	3,43±0,00 b	3,21±0,10 c	3,50±0,30	3,21±0,10 bc
		N	2,50±0,51 a	2,61±0,05 b	2,68±0,56 b	2,64±0,51 ab	2,86±0,20	2,75±0,86 ab
	Carvalho	B	2,57±0,00 a	2,57±0,00 a	2,86±0,20 a	2,79±0,10 ab	2,93±0,10	3,14±0,20 bc
		15	2,57±0,20 a	2,50±0,10 a	2,79±0,10 a	3,00±0,20 bc	2,93±0,10	2,57±0,20 ab
		30	2,36±0,51 a	2,50±0,51 a	2,29±0,61 a	2,36±0,51 a	2,57±0,61	2,29±0,61 a
		60	2,89±0,15 ab	2,68±0,05 a	3,07±0,10 a	3,00±0,00 bc	3,00±0,40	3,04±0,35 b
		N	2,64±0,30 a	2,50±0,51 a	2,57±0,40 a	2,50±0,51 a	2,79±0,71	2,57±0,20 ab
G ₆	Castanho	B	3,27±0,19 c	3,11±0,38 b	3,38±0,31 b	3,27±0,15 c	3,54±0,22	3,41±0,28 c
		15	3,20±0,18 c	2,73±0,29 b	3,14±0,15 b	3,43±0,13 c	3,55±0,15	3,55±0,09 c
		30	2,85±0,36 ab	2,56±0,41 b	2,96±0,45 b	3,17±0,63 c	3,17±0,61	3,06±0,58 b
		60	3,07±0,25 bc	2,64±0,36 b	3,14±0,20 b	3,29±0,20 c	3,32±0,27	3,43±0,12 c
		N	2,75±0,29 a	2,46±0,41 b	2,73±0,28 b	2,98±0,43 bc	2,93±0,41	3,04±0,39 b
	Carvalho	B	2,61±0,18 a	2,39±0,07 a	2,55±0,21 a	2,68±0,32 ab	2,89±0,14	2,79±0,08 ab
		15	2,71±0,12 a	2,46±0,18 a	2,75±0,21 a	2,96±0,36 bc	3,14±0,12	3,11±0,32 bc
		30	2,68±0,28 a	2,48±0,29 a	2,68±0,44 a	2,73±0,26 ab	2,98±0,21	2,86±0,36 ab
		60	2,73±0,19 ab	2,29±0,12 a	2,41±0,17 a	2,72±0,12 ab	2,88±0,21	3,02±0,19 b
		N	2,64±0,44 a	2,46±0,24 a	2,71±0,48 a	2,79±0,34 ab	3,07±0,25	2,86±0,12 ab
Tempo [T]	n.s.	n.s.	n.s.	7,1*	n.s.	10,0*		
Madeira [W]	45,0***	25,8**	51,8***	39,6***	n.s.	35,5***		
Modalidade [M]	10,1*	n.s.	n.s.	10,6*	n.s.	12,5*		
TxW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
TxM	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
WxM	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
Erro	44,9	74,2	48,2	42,7		41,9		

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.3.1. Efeito da madeira

As intensidades dos descritores de sabor foram significativamente influenciadas pela madeira, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes descritores. Assim, a madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) na intensidade dos descritores corpo (45,0% da variação total), evolução (51,8% da variação total), complexidade (39,6% da variação total) e persistência (35,5% da variação total) e muito significativo ($\alpha < 0,01$) na intensidade do descritor untuosidade (25,8% da variação total). Este fator não teve efeito significativo nos restantes descritores de sabor.

Os descritores untuosidade, evolução, complexidade e persistência apresentam maior intensidade nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados obtidos noutros estudos (Caldeira *et al.*, 2013, 2016; Granja-Soares *et al.*, 2020). A maior intensidade destes descritores sugere que as aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro têm características de maior envelhecimento em relação às aguardentes envelhecidas e madeira de carvalho.

2.3.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As intensidades da maioria dos descritores de sabor não foram significativamente influenciadas pelas condições de oxigenação. Este fator teve apenas efeito significativo ($\alpha < 0,05$) na intensidade dos descritores corpo (10,1% da variação total), complexidade (10,6% da variação total) e persistência (12,5% da variação total), sendo o fator que menos contribuiu para a explicação da variabilidade total observada.

2.3.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

As intensidades dos descritores de sabor foram significativamente influenciadas pelo tempo, embora os níveis de significância sejam distintos para os diferentes descritores. Assim, o tempo teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) na intensidade dos descritores doce (69,9% da variação total) e amargo (53,5% da variação total), muito significativo ($\alpha < 0,01$) na intensidade do descritor adstringência (26,1% da variação total) e significativo ($\alpha < 0,05$) nos descritores complexidade (7,1% da variação total) e persistência (10,0% da variação total). Este fator não teve efeito significativo nos restantes descritores de sabor.

A intensidade do descritor doce e adstringência tem tendência em diminuir ao longo do tempo enquanto a intensidade dos descritores amargo e persistência têm tendência em aumentar.

2.4 Apreciação de aroma, sabor e apreciação geral de aguardente conservada em garrafa

Na Tabela 16 apresentam-se os resultados da ANOVA e do teste de comparação de médias (LSD-Fisher) realizados aos resultados da apreciação do aroma, do sabor e geral nas aguardentes em estudo.

Tabela 16: Resultados da ANOVA relativa à apreciação do aroma, do sabor e geral (média e desvio padrão).

Code		Ap. Aroma	Ap. Sabor	Ap. Geral
Go	Castanho			
	B	14,14±0,20 abc	14,07±0,51 b	14,14±0,20 bc
	15	14,29±0,81 abc	14,14±0,40 b	14,11±0,05 bc
	30	13,00±1,01 a	13,21±1,31 b	12,93±1,31 a
	60	14,89±0,96 bc	14,86±0,61 b	14,96±0,76 c
N	13,50±0,71 ab	12,89±1,06 b	13,07±1,11 a	
Carvalho	B	13,71±0,81 ab	13,36±0,30 ab	13,46±0,56 ab
	15	13,71±0,61 ab	13,64±0,30 ab	13,61±0,56 ab
	30	13,07±1,11 a	12,57±1,62 ab	12,75±1,36 a
	60	13,93±0,20 ab	13,96±0,05 ab	14,00±0,10 b
	N	13,39±0,15 ab	13,14±1,21 ab	13,25±1,06 a
G6	Castanho			
	B	14,74±0,21 bc	14,67±0,23 c	14,69±0,22 bc
	15	15,20±0,16 c	15,11±0,18 c	15,18±0,19 c
	30	14,61±1,03 bc	14,25±1,22 c	14,40±1,09 bc
	60	14,91±0,44 bc	14,71±0,35 c	14,73±0,24 bc
N	14,10±0,95 ab	13,88±0,73 c	13,94±0,71 b	
Carvalho	B	13,48±0,49 ab	13,21±0,47 a	13,30±0,48 a
	15	13,88±0,57 ab	13,48±0,23 a	13,63±0,28 ab
	30	13,45±1,09 ab	12,94±0,59 a	13,17±0,89 a
	60	14,29±0,24 bc	13,35±0,16 a	13,69±0,15 ab
	N	13,36±0,44 ab	13,30±0,32 a	13,30±0,33 a
Tempo [T]		8,8*	n.s.	5,1*
Madeira [W]		39,7***	49,4***	42,7***
Modalidade [M]		15,3**	12,1**	13,1**
TxW		n.s.	12,9*	12,6*
TxM		n.s.	n.s.	n.s.
WxM		n.s.	n.s.	n.s.
Erro		36,3	25,5	26,4

n.s.: não significativo; *significativo ($\alpha < 0,05$); **muito significativo ($\alpha < 0,01$); ***altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Os valores médios com a mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas entre si, para um nível de significância de $\alpha < 0,05$.

2.4.1. Efeito da madeira

A madeira teve um efeito altamente significativo ($\alpha < 0,001$) nas apreciações do aroma (39,7% da variação total), do sabor (49,4% da variação total) e geral (42,7% da variação total). Verificou-se que, para todas as apreciações, o efeito da madeira é o principal fator que contribui para explicar a variação observada.

As apreciações de aroma, sabor e geral são maiores nas aguardentes envelhecidas em madeira de castanheiro. A maior apreciação geral encontrada nas aguardentes envelhecidas em castanheiro está de acordo com os resultados obtidos noutros estudos (Caldeira *et al.*, 2010, 2013; Granja-Soares *et al.*, 2020) e confirmam o interesse desta madeira para o envelhecimento de aguardentes vínicas.

2.4.2. Efeito das condições de oxigenação (modalidade)

As condições de oxigenação tiveram um efeito muito significativo ($\alpha < 0,01$) nas apreciações do aroma (15,3% da variação total), sabor (12,1% da variação total) e geral (13,1% da variação total).

Para os três tipos de apreciação das aguardentes, as maiores intensidades foram tendencialmente encontradas nas aguardentes oriundas do sistema de envelhecimento alternativo com 60 dias de microoxigenação e do sistema de tradicional de envelhecimento em vasilha.

2.4.3. Efeito do tempo de conservação em garrafa

O tempo teve um efeito significativo ($\alpha < 0,05$) na apreciação do aroma (8,8% da variação total) e na apreciação geral (5,1% da variação total). No entanto, este fator não teve efeito significativo na apreciação do sabor.

As apreciações do aroma e geral têm tendência em aumentar ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que a aguardente em garrafa evolui positivamente em termos da sua qualidade global, provavelmente devido às modificações físico-químicas que parecem ocorrer dentro da garrafa.

3. Análise dos componentes principais (PCA)

Tendo em conta os resultados da ANOVA efetuada anteriormente e recorrendo apenas às variáveis em que se detetaram efeitos significativos dos fatores em estudo, foi efetuada uma análise de componentes principais com o propósito de ajudar a compreender a relação entre os resultados da análise sensorial e a análise dos compostos voláteis. Com esta análise pretende-se igualmente verificar a utilidade das variáveis para discriminar as amostras de diferentes modalidades de envelhecimento e diferentes tempos de envelhecimento.

3.1 Projeções dos compostos voláteis

As projeções no plano dos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3) são apresentadas na Fig. 8. A projeção dos compostos voláteis normalizado com os efeitos de cada fator estudado (A e B) reuniu cerca de 64% de variância total acumulada. A projeção das amostras de aguardente, efetuada em PCA simples (C e D) reuniu cerca de 67% de variância total acumulada.

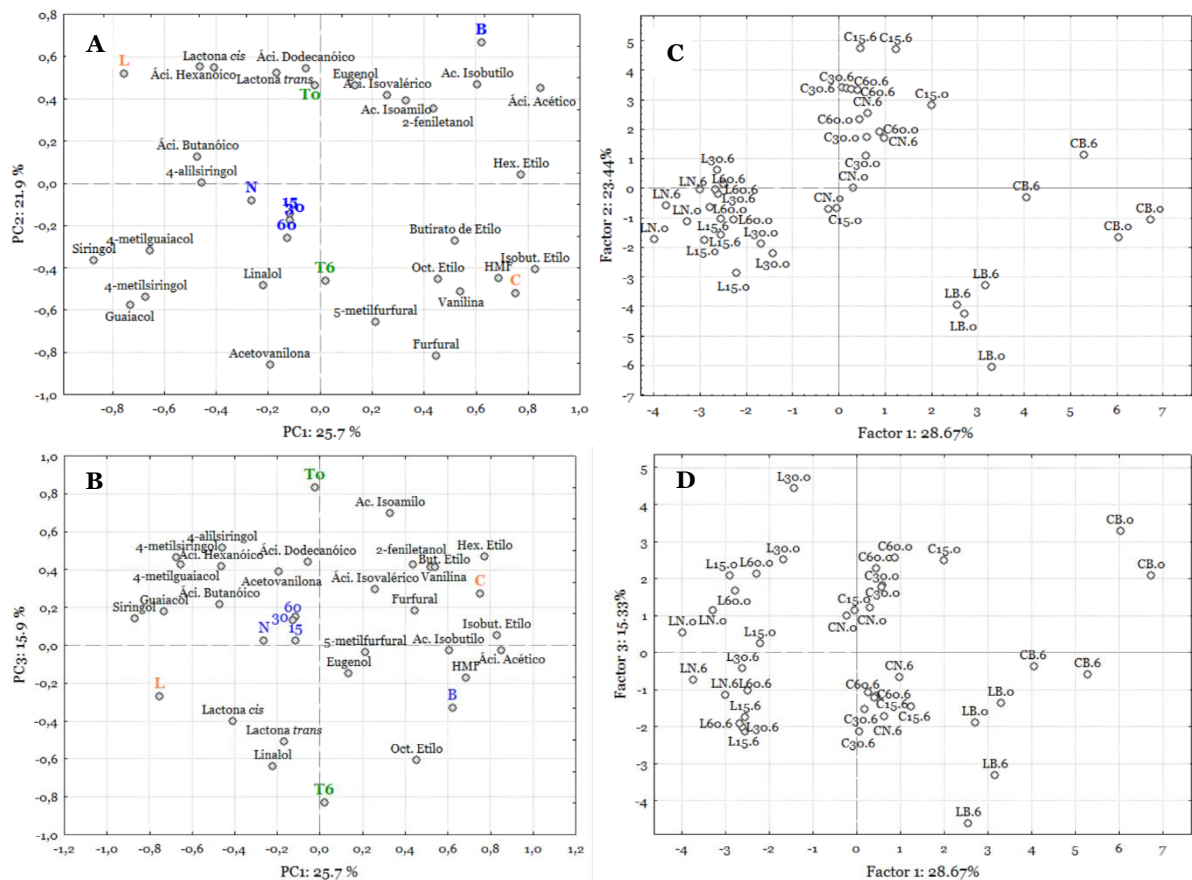


Figura 8: Projeção no plano dos compostos voláteis e das amostras de aguardente em relação aos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3).

A e B: normalizado com os efeitos dos estudados. C e D: projeção de todas as amostras estudadas.

O primeiro componente representa 25,7% da variância total, e parece contribuir para a separação das amostras de aguardente em função do tipo de madeira usado no envelhecimento e do sistema de envelhecimento (Fig. 8A). As amostras de aguardente envelhecidas no sistema tradicional em vasilha (B) posicionam-se do lado positivo do componente 1 e as amostras do sistema alternativo (15, 30, 60 e N) tendem a localizar-se do lado oposto, não se verificando grande discriminação entre elas. Ao sistema tradicional aparecem associadas com maior peso as variáveis acetato de isobutilo e ácido acético, enquanto que ao sistema alternativo aparecem associadas os fenóis voláteis (4-metilguaiacol, siringol, 4-metilsiringol e guaiacol). No que se refere à separação das madeiras observa-se que as amostras que envelheceram em castanheiro (C) se localizam maioritariamente do lado positivo e as que envelheceram em carvalho Limousin (L) se localizam maioritariamente do lado negativo. Associada à madeira de castanheiro aparecem os elevados teores de vanilina, isobutirato de etilo e HMF enquanto que à madeira de carvalho Limousin aparecem os elevados teores de β -metil- γ -octalactona e ácido hexanóico.

O segundo componente que explica 21,9% da variância total, e reforça a discriminação observada anteriormente no que se refere a madeiras utilizadas no envelhecimento e sistemas de envelhecimento (Fig. 8A). Pode verificar-se ainda uma separação da modalidade com azoto (N), das outras modalidades de oxigenação. Esta variação é ténue devido ao forte efeito da vasilha em relação a estas modalidades.

O terceiro componente que explica 15,9% da variância total e contribui para a separação das amostras de aguardente em função do tempo de conservação em garrafa, localizando-se as amostras do tempo zero (T0) do lado positivo do eixo e as amostras após a conservação de seis meses em garrafa (T6) a localizarem-se do lado negativo (Fig. 8B). As variáveis com maior contributo para este componente são o acetato de isoamilo para o lado positivo e o linalol e octanoato de etilo para o lado negativo.

Na Figura 8 (B e C) estão representadas as projeções das diferentes amostras como resultado de uma PCA simples sem entrar com os efeitos estudados. Neste caso pode observar-se claramente o posicionamento das diferentes amostras reforçando as diferenças entre madeiras utilizadas no envelhecimento, sistemas (Vasilha *vs* Sistema alternativo) e os diferentes níveis de oxigenação.

3.2 Projeções dos descritores sensoriais

As projeções no plano dos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3) são apresentadas na Fig. 9. A projeção dos descritores sensoriais normalizado com os efeitos de cada fator estudado (A e B) reuniu cerca de 57,7% de variância total acumulada.

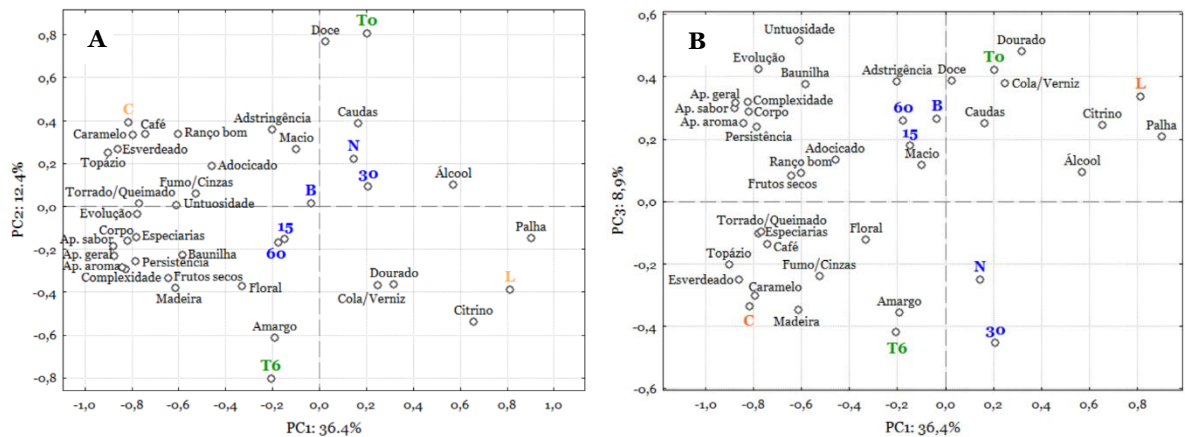


Figura 9: Projeção no plano dos descritores sensoriais em relação aos três primeiros componentes principais (PC1 vs PC2 e PC1 vs PC3). A e B: normalizado com os efeitos dos estudados.

O primeiro componente representa 36,4% da variância total, e parece contribuir para a separação das amostras de aguardente em função do tipo de madeira usado no envelhecimento e do sistema de envelhecimento (Fig. 9A). No que se refere à separação das madeiras observa-se que as amostras que envelheceram em castanheiro (C) se localizam maioritariamente do lado negativo e as que envelheceram em carvalho *Limousin* (L) se localizam maioritariamente do lado positivo. Associada à madeira de carvalho *Limousin* aparecem os descritores de palha, citrino, dourado e cola/verniz enquanto que a maioria dos restantes descritores se encontram associados à madeira de castanheiro. As amostras de aguardente envelhecidas no sistema alternativo nas modalidades de azoto (N) e 30 dias de microoxigenação (30) posicionam-se do lado positivo do componente principal 1 e as restantes amostras do sistema alternativo (15 e 60) e as do sistema tradicional (B) tendem a localizar-se do lado oposto. Ao sistema alternativo nas modalidades de azoto e 30 dias de microoxigenação aparecem associadas com maior peso as variáveis caudas e álcool.

O segundo componente que explica 12,4% da variância total, e reforça a discriminação observada anteriormente no que se refere a madeiras utilizadas no envelhecimento e sobretudo relativo à discriminação com o tempo de envelhecimento (Fig. 9A). As amostras do tempo zero (T0) localizam-se do lado positivo do eixo e as amostras após a

conservação de seis meses em garrafa (T6) localizam-se do lado negativo. Ao tempo zero aparecem associadas com maior peso o descritor doce, enquanto que para as amostras após conservação de seis meses em garrafa se encontram maioritariamente associadas ao descritor amargo.

O terceiro componente que explica 8,9% da variância total e contribui para a separação das amostras de aguardente em função modalidades de microoxigenação (Fig. 9B) e mais uma vez reforça a separação da qualidade das amostras em função dos diferentes fatores selecionados no estudo. As variáveis com maior contributo para este componente são o dourado e cola/verniz para o lado positivo e o amargo para o lado negativo.

Capítulo 5 - Conclusões

Tendo em conta os resultados apresentados no decorrer do presente trabalho, apresentam-se as considerações finais.

Neste trabalho foram identificados e quantificados em aguardentes vínicas envelhecidas cerca de 30 compostos odorantes pertencentes a diferentes famílias químicas nomeadamente fenóis (fenóis voláteis, aldeídos fenólicos e fenilcetonas), lactonas (isómeros da β -metil- γ -octalactona), aldeídos furânicos, ésteres, ácidos, álcoois e compostos terpénicos, com origem no destilado e/ou provenientes do contacto com a madeira.

Foram estudados diferentes fatores, nomeadamente o tipo de madeira, sistema de envelhecimento e tempo de conservação em garrafa e avaliada a sua influência no teor dos compostos voláteis odorantes e na análise sensorial das aguardentes envelhecidas, tendo-se verificado que o tipo de madeira utilizado foi o fator mais discriminante.

Tendo em conta os resultados apresentados é possível afirmar que este trabalho confirmou as potencialidades da utilização da madeira de castanheiro no envelhecimento de aguardentes.

O sistema de envelhecimento alternativo (aduelas + microoxigenação) originou aguardentes com uma composição química diferenciada em relação ao sistema tradicional e também com alguma diferenciação no perfil sensorial. Assim, as aguardentes de sistema alternativo aparecem associadas a teores mais elevados de alguns compostos odorantes, nomeadamente alguns fenóis voláteis. Relativamente às diferentes modalidades de microoxigenação estudadas, no sistema alternativo a que revelou melhores resultados, do ponto de vista sensorial, foi aquela em que a microoxigenação de maior fluxo se realizou durante os primeiros 60 dias e só depois se reduziu durante o restante tempo de envelhecimento.

A conservação das aguardentes em garrafa é uma prática que ocorre habitualmente depois do envelhecimento em madeira e sobre a qual não existia qualquer informação científica publicada, que se tenha conhecimento. Este trabalho apresenta os primeiros resultados sobre este tema. Os resultados obtidos sugerem que estarão a ocorrer fenómenos químicos dentro da garrafa dado que se verificou a alteração de teores de alguns compostos voláteis odorantes e em termos sensoriais verificou-se um aumento da

apreciação geral da aguardente. Este trabalho constituiu uma primeira abordagem sobre esta temática, sendo necessário realizar mais estudos para aprofundar os resultados obtidos.

Finalmente é importante salientar que parte dos resultados e conclusões do presente trabalho deram origem a uma comunicação oral apresentada no congresso CMR-International Conference on Multidisciplinary Research, cujo resumo foi publicado na revista *Millenium* intitulado de “Volatile Phenols in Aged Wine Spirits: Role, Contents and Impact of Ageing Systems” (Anexo II), um resumo intitulado de “FTIR-ATR, FT-RAMAN and GC-FID assessment of discrimination of aged wine spirits under different conditions” está aceite para apresentação em póster no âmbito do XV Encontro de Química dos Alimentos (Anexo III) que decorrerá de 5 a 8 de Setembro de 2021, no Funchal, Ilha da Madeira. Este trabalho deu ainda origem a um artigo publicado com o título “Wine Spirit Ageing with Chestnut Staves under Different Micro-Oxygenation Strategies: Effect on the Volatile Compounds and Sensory Profile” na revista *Applied Sciences* 2021, Volume 11, Issue 9, 3991 (Anexo IV).

Bibliografia

- Alamo-Sanza, M. del, Nevares, I., Martínez-Gil, A., Rubio-Bretón, P., & Garde-Cerdán, T. (2019). Impact of long bottle aging (10 years) on volatile composition of red wines micro-oxygenated with oak alternatives. *Lwt*, *101*(June 2018), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.049>
- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2012). Aromatic potential of *Castanea sativa* Mill. Compared to *Quercus* species to be used in cooperage. *Food Chemistry*, *130*(4), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.111>
- Alañón, M. E., Schumacher, R., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, I. J., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2013). Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines part I: Volatile compounds and sensorial properties. *Food Research International*, *51*(1), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.007>
- Alvelos, H. (2002). *Análise, Desenvolvimento e Teste de métodos e técnicas para controlo estatístico em análise sensorial*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Anjos, O., Carmona, C., Caldeira, I., & Canas, S. (2013). Variation of extractable compounds and lignin contents in wood fragments used in the aging of wine brandies. *BioResources*, *8*(3), 4484–4496. <https://doi.org/10.15376/biores.8.3.4484-4496>
- Arfelli, G., Sartini, E., Corzani, C., & Fabiani, A. (2011). Chips, lees, and micro-oxygenation: Influence on some flavors and sensory profile of a bottled red Sangiovese wine. *European Food Research and Technology*, *233*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1480-2>
- Awad, P., Athès, V., Decloux, M. E., Ferrari, G., Snakkers, G., Raguenaud, P., & Giampaoli, P. (2017). Evolution of Volatile Compounds during the Distillation of Cognac Spirit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 7736–7748. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02406>
- Bech, A. C., Engelund, E., Juhl, H. J., Kristensen, K., & Poulsen, C. S. (1994). QFood - Optimal design of food products. *MAPP*, *19*.
- Belchior, A. P., Almeida, T. G. T., Mateus, A. M., & Canas, S. (2003). Ensaio laboratorial sobre a cinética de extração de compostos de baixa massa molecular da madeira pela aguardente. *Ciencia e Técnica Vitivinícola*, *18*(1), 29–41.
- Belchior, A. P., Caldeira, I., Costa, S., Lopes, C., Tralhão, G., Ferrão, A., Mateus, A., & Carvalho, E. (2001). Evolução das Características Físico-Químicas e Organolépticas de Aguardentes Lourinhã ao Longo de Cinco Anos de Envelhecimento em Madeiras de Carvalho e de Castanheiro. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, *16*(2), 81–94.
- Belchior, A. P., Canas, S., Caldeira, I., & Carvalho, E. (2015). *Aguardentes vinícolas – Tecnologias de produção e envelhecimento, Controlo de Qualidade*. (Agrobook (ed.)). Publindústria - Edições Técnicas.
- Belchior, A. P., & Mateus, A. M. (2005). Comparação Do Envelhecimento De Aguardente Lourinhã Em Vasilhas De Madeiras De Castanheiro E De Carvalho E Em Dois Volumes. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, *20*(2), 91–103.
- Berk, Z. (2009). Distillation. In Food Science and Technology (Ed.), *Food process engineering and technology* (First, pp. 295–316). Elsevier.
- Bertrand, A. (2003). Armagnac and Wine-Spirits. In A. G. H. Lea & J. Piggot (Eds.), *Fermented Beverage Production* (pp. 213–238). Springer US.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0187-9_10

- Bertrand, A., Marly-Brugerolle, C., & Sarre, C. (1978). Influence du debourbage des mouts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et des eaux-de-vie. *Connaissance Vigne Vin*, 12(1), 35–48.
- Biniecka, M., & Caroli, S. (2011). Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1756–1770. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.015>
- Bortoletto, A. M., & Alcarde, A. R. (2015). Aging marker profile in cachaça is influenced by toasted oak chips. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 70–77. <https://doi.org/10.1002/jib.202>
- Bourgois, J., & Guyonnet, R. (1988). Characterization and analysis of torrefied wood. *Wood Science and Technology*, 22(2), 143–155. <https://doi.org/10.1007/BF00355850>
- Cabrita, M. J., Dias, C. B., & Freitas, A. M. C. (2011). Phenolic Acids, Phenolic Aldehydes and Furanic Derivatives in Oak Chips: American vs. French Oaks. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(2), 204–210. <https://doi.org/10.21548/32-2-1380>
- Cabrita, M. J., Garcia, R., Martins, N., da Silva, M. D. R. G., & Costa Freitas, A. M. (2012). Gas Chromatography in the Analysis of Compounds Released from Wood into Wine. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. <https://doi.org/10.5772/32659>
- Caldeira, I. (2004). O Aroma De Aguardentes Vínicas Envelhecidas Em Madeira. Importância Da Tecnologia De Tanoria [Universidade Técnica de Lisboa]. In *Dissertação de Doutoramento*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1858.4722>
- Caldeira, I., Anjos, O., Belchior, A. P., & Canas, S. (2017). Sensory impact of alternative ageing technology for the production of wine brandies. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 32(1), 12–22. <https://doi.org/10.1051/ctv/20173201012>
- Caldeira, I., Anjos, O., Portal, V., Belchior, A. P., & Canas, S. (2010). Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.059>
- Caldeira, I., Anjos, O., Portal, V., & Canas, S. (2009). Envelhecimento Acelerado De Aguardentes Vínicas Na Presença De Fragmentos De Madeira . Influência Nos Compostos Odorantes. *Comunicação Oral - 9º Encontro de Química Dos Alimentos*, 1–6.
- Caldeira, I., Belchior, A. P., & Canas, S. (2013). Effect of alternative ageing systems on the wine brandy sensory profile. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 28, 9–18.
- Caldeira, I., Belchior, A. P., Clímaco, M. C., & Bruno de Sousa, R. (2002). Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01522-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01522-7)
- Caldeira, I., Bruno de Sousa, R., Belchior, A. P., Clímaco, M. C., Sousa, R. B., Belchior, A. P., Clímaco, M. C., de Sousa, R. B., Belchior, A. P., & Clímaco, M. C. (2008). A sensory and chemical approach to the aroma of wooden aged Lourinhã wine brandy. *Ciência e Técnica Vitivinicola*, 23(2), 97–110.
- Caldeira, I., Canas, S., Costa, S., Carvalho, E., & Belchior, A. P. (1999). Formação de uma Camara de Prova Organoléptica de Aguardentes Velhas e Seleção de Descritores Sensoriais. *Ciência e Técnica Vitivinicola*, 14(4), 21–30.
- Caldeira, I., Mateus, A. M., & Belchior, A. P. (2006). Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 264–273.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.008>

- Caldeira, I., Pereira, R., Clímaco, M. C., Belchior, A. P., & Bruno de Sousa, R. (2004). Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, *513*(1), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.011>
- Caldeira, I., Santos, R., Ricardo-Da-Silva, J. M., Anjos, O., Mira, H., Belchior, A. P., & Canas, S. (2016). Kinetics of odorant compounds in wine brandies aged in different systems. *Food Chemistry*, *211*, 937–946. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.129>
- Câmara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta*, *68*, 1512–1521. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.012>
- Canas, S. (2017). Phenolic Composition and Related Properties of Aged Wine Spirits: Influence of Barrel Characteristics. A Review. *Beverages*, *3*(4), 55. <https://doi.org/10.3390/beverages3040055>
- Canas, S., Belchior, A. P., Mateus, A. M., Spranger, M. I., & Bruno de Sousa, R. (2002). Kinetics of impregnation/evaporation and release of phenolic compounds from wood to brandy in experimental model. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, *17*, 1–14.
- Canas, S., Caldeira, I., Anjos, O., & Belchior, A. P. (2019b). Phenolic profile and colour acquired by the wine spirit in the beginning of ageing: Alternative technology using micro-oxygenation vs traditional technology. *LWT*, *111*(March), 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.018>
- Canas, S., Caldeira, I., Anjos, O., Lino, J., Soares, A., & Pedro Belchior, A. (2016). Physicochemical and sensory evaluation of wine brandies aged using oak and chestnut wood simultaneously in wooden barrels and in stainless steel tanks with staves. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(12), 2537–2545. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13235>
- Canas, S., Caldeira, I., & Belchior, A. P. (2009). Comparison of alternative systems for the ageing of wine brandy. Wood shape and wood botanical species effect. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, *24*, 91–99.
- Canas, S., Caldeira, I., & Belchior, A. P. (2013). Extraction/oxidation kinetics of low molecular weight compounds in wine brandy resulting from different ageing technologies. *Food Chemistry*, *138*(4), 2460–2467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.018>
- Canas, S., Caldeira, I., Belchior, A. P., Spranger, M. I., Clímaco, M. C., & Bruno de Sousa, R. (2018). Chestnut wooden barrels for the ageing of wine spirits. *International Organisation of Vine and Wine*.
- Canas, S., Caldeira, I., Belchior, A. P., Spranger, M. I., & de Sousa, R. B. (2019a). Madeiras utilizadas no envelhecimento de aguardente vínica. *Vida Rural*, *March*, 28–31.
- Canas, S., Caldeira, I., Pedro Belchior, A., M.I., S., Clímaco, M. C., & Bruno de Sousa, R. (2011). Chestnut Wood: A sustainable alternative for the aging of wine brandies. In D. Medina & A. Laine (Eds.), *Food Quality: Control, Analysis and Consumer Concerns* (pp. 181–228). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Canas, S., Casanova, V., & Pedro Belchior, A. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.001>
- Canas, S., Danalache, F., Anjos, O., Fernandes, T. A., Caldeira, I., Santos, N., Fargeton, L., Boissier, B., & Catarino, S. (2020). Behaviour of Low Molecular Weight Compounds, Iron and Copper of Wine Spirit Aged with Chestnut Staves under

- Different Levels of Micro-Oxygenation. *Molecules*, 25(22), 5266. <https://doi.org/10.3390/molecules25225266>
- Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., & Belchior, A. P. (1999). Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castanea sativa* L.) and corresponding aged brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5023–5030. <https://doi.org/10.1021/jf9900480>
- Carmo, J. (2018). *Manual de boas práticas em análise sensorial*. Instituto Superior Politécnico de Viseu.
- Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2019). Wine evolution during bottle aging, studied by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International*, 116(April 2018), 566–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.075>
- Cejudo-Bastante, M. J., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2011). Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines. *Food Chemistry*, 124(3), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.067>
- Chatonnet, P., Boidron, J.-N., & Pons, M. (1989). Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2e partie: évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *OENO One*, 23(4), 223. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1989.23.4.1722>
- Coldea, T. E., Mudura, E., & Socaciu, C. (2017). Advances in Distilled Beverages Authenticity and Quality Testing. In *Ideas and Applications Toward Sample Preparation for Food and Beverage Analysis* (pp. 109–130). <https://doi.org/10.5772/intechopen.72041>
- Coldea, T. E., Socaciu, C., Mudura, E., Socaci, S. A., Ranga, F., Pop, C. R., Vriesekoop, F., & Pasqualone, A. (2020). Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips. *Food Chemistry*, 320, 126643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126643>
- Cutzach, I., Chatonnet, P., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1997). Identification of Volatile Compounds with a “Toasty” Aroma in Heated Oak Used in Barrelmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2217–2224. <https://doi.org/10.1021/jf960947d>
- De Aquino, F. W. B., Rodrigues, S., Do Nascimento, R. F., & Casimiro, A. R. S. (2006). Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. *Food Chemistry*, 98(3), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.034>
- De Rosso, M., Cancian, D., Panighel, A., Dalla Vedova, A., & Flamini, R. (2009). Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: Volatile compounds and polyphenols. *Wood Science and Technology*, 43(5–6), 375–385. <https://doi.org/10.1007/s00226-008-0211-8>
- Decreto-Lei nº 323/1994 de 21 de Dezembro do Ministério da Agricultura, Pub. L. No. Diário da República: I série-A, Nº300 (1994). www.dre.pt
- Doerr, R. C., Wasserman, A. E., & Fiddler, W. (1966). Composition of Hickory Sawdust Smoke. Low-Boiling Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(6), 662–665. <https://doi.org/10.1021/jf60148a035>
- Eiriz, N., Santos Oliveira, J., & Clímaco, M. (2007). Fragmentos de madeira de carvalho no estágio de vinhos tintos. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 22(2), 63–71.
- Faisca, M. (2012). Pesquisa de marcadores químicos e sensoriais associados à fração final de destilação em aguardentes vnicas. In *Relatório de Estágio*. Universidade do Algarve.

- Faúndez, C. A., Alvarez, V. H., & Valderrama, J. O. (2006). Predictive models to describe VLE in ternary mixtures water + ethanol + congener for wine distillation. *Thermochimica Acta*, 450(1–2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.09.005>
- Fengel, D., & Wegener, G. (1989). *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. (Walter de Gruyter (ed.)).
- Fernández de Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., & Muñoz, A. M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, 147, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.158>
- Ferrari, G., Lablanquie, O., Cantagrel, R., Ledauphin, J., Payot, T., Fournier, N., & Guichard, E. (2004). Determination of key odorant compounds in freshly distilled Cognac using GC-O, GC-MS, and sensory evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5670–5676. <https://doi.org/10.1021/jfo49512d>
- Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Culleré, L., & Fernández-Zurbano, P. (2014). Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of Spanish red wines under different oxygen levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10015–10027. <https://doi.org/10.1021/jf503089u>
- Fiddler, W., Doerr, R. C., & Wasserman, A. E. (1970). Composition of an Ether-Soluble Fraction of a Liquid Smoke Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(2), 310–312. <https://doi.org/10.1021/jf60168a015>
- Fiddler, W., Doerr, R. C., Wasserman, A. E., & Salay, J. M. (1966). Composition of Hickory Sawdust Smoke. Furans and Phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(6), 659–662. <https://doi.org/10.1021/jf60148a034>
- Gambutì, A., Capuano, R., Lisanti, M. T., Strollo, D., & Moio, L. (2010). Effect of aging in new oak, one-year-used oak, chestnut barrels and bottle on color, phenolics and gustative profile of three monovarietal red wines. *European Food Research and Technology*, 231(3), 455–465. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1292-9>
- Garreau, C. (2008). L'Armagnac. In A. Bertrand (Ed.), *Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole* (pp. 39–60). Lavoisier-TEC & DOC.
- Giuffrida de Esteban, M. L., Ubeda, C., Heredia, F. J., Catania, A. A., Assof, M. V., Fanzone, M. L., & Jofre, V. P. (2019). Impact of closure type and storage temperature on chemical and sensory composition of Malbec wines (Mendoza, Argentina) during aging in bottle. *Food Research International*, 125(July). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108553>
- Gómez-Plaza, E., & Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry*, 125(4), 1131–1140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.034>
- Granja-Soares, J. (2019). Influência do sistema de envelhecimento no perfil de compostos odorantes de aguardentes vînicas. In *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Évora.
- Granja-Soares, J., Roque, R., Cabrita, M. J., Anjos, O., Belchior, A. P., Caldeira, I., & Canas, S. (2020). Effect of innovative technology using staves and micro-oxygenation on the odorant and sensory profile of aged wine spirit. *Food Chemistry*, 333, 127450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127450>
- Gregorio, L. L., Caparroz, F., Nunes, L. M. A., Neves, L. R., & Macoto, E. K. (2014). Distúrbios da olfação: Estudo retrospectivo. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 80(1), 11–17. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20140005>
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments,

- aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26(5), 533–545. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.5.533>
- Hernández-Orte, P., Lapeña, A. C., Escudero, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L., Ferrer, S., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.020>
- Heymann, H., Machado, B., Torri, L., & Robinson, A. L. (2012). How many judges should one use for sensory descriptive analysis? *Journal of Sensory Studies*, 27(2), 111–122. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2012.00373.x>
- Ilc, T., Werck-Reichhart, D., & Navrot, N. (2016). Meta-analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Frontiers in Plant Science*, 7(September2016), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01472>
- Janáčková, A., Sádecká, J., Kohajdová, Z., & Špánik, I. (2008). The identification of aroma-active compounds in Slovak brandies using GC-sniffing, GC-MS and sensory evaluation. *Chromatographia*, 67(SUPPL. 1), 113–121. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0635-1>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*.
- Keller, R. (1987). Différentes variétés de chênes et leur répartition dans le monde. *OENO One*, 21(3), 191. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1987.21.3.1281>
- Lablanquie, O., Snackers, G., Cantagrel, R., & Ferrari, G. (2002). Characterisation of young Cognac spirit aromatic quality. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 191–196. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01563-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01563-X)
- Le Floch, A., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2015). Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydrate Research*, 417, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.07.003>
- Léauté, R. (1990). Distillation in alambic. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 90–103.
- Léauté, R., Mosedale, J. R., Mourgues, J., & Puech, J. L. (1998). Barrique et Vieillessement Des Eaux-de-Vie. In C. Flanzy (Ed.), *Oenologie Fondements Scientifiques et Technologiques* (pp. 1085–1142). Tec&Doc.
- Ledauphin, J., Basset, B., Cohen, S., Payot, T., & Barillier, D. (2006). Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and sulphur compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.03.001>
- Lesdéma, A., Marsset-Baglieri, A., Talbot, L., Arlotti, A., Delarue, J., Fromentin, G., Marcuz, M. C., & Vinoy, S. (2016). When satiety evaluation is inspired by sensory analysis: A new approach. *Food Quality and Preference*, 49, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.11.004>
- Liu, D., Xing, R. R., Li, Z., Yang, D. M., & Pan, Q. H. (2016). Evolution of volatile compounds, aroma attributes, and sensory perception in bottle-aged red wines and their correlation. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1937–1948. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2693-1>
- Lurton, L., Ferrari, G., & Snackers, G. (2012). Cognac: production and aromatic characteristics. In J. R. Piggot (Ed.), *Alcoholic Beverages* (pp. 242–266). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.242>
- Macfie, H. J. H. J. M., Bratchell, N., Greenhoff, H., Vallis, L. V. L. V. L. V., Greenhoff, K., & Vallis, L. V. L. V. L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation

- and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4(2), 129–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1989.tb00463.x>
- Marx, Í., Rodrigues, N., Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., Drunkler, D. A., & Peres, A. M. (2017). Sensory classification of table olives using an electronic tongue: Analysis of aqueous pastes and brines. *Talanta*, 162(October 2016), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.028>
- Mira, R. (2009). *Actividade Antioxidante de Aguardentes Vínicas Envelhecidas Portuguesas e Francesas*. Instituto Politécnico de Beja.
- Mosedale, J. R. (1995). Effects of oak wood on the maturation of alcoholic beverages with particular reference to whisky. *Forestry*, 68(3), 203–230. <https://doi.org/10.1093/forestry/68.3.203>
- Mosedale, J. R., & Puech, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9(3), 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00024-7)
- Nishimura, K., Ohnishi, M., Masuda, M., Koga, K., & Matsuyama, R. (1983). Reactions of wood components during maturation. In Piggott J.R. (Ed.), *Flavour of distilled beverages: origin and development* (pp. 241–255). Ellis Horwood Limited.
- Norma ISO 3591:1977. Sensory analysis - Wine-tasting glass.
- Norma ISO 5492:2008. Sensory analysis - Vocabulary.
- Norma ISO 8586:2012. Sensory analysis - General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.
- Norma ISO 8589:2007. Sensory analysis - General guidance for the design of test room.
- Otsuka, K. I., Zenibayashi, Y., Itoh, M., & Totsuka, A. (1974). Presence and significance of two diastereomers of β -methyl- γ -octalactone in aged distilled liquors. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(3), 485–490. <https://doi.org/10.1080/00021369.1974.10861194>
- Panagou, E. Z., Sahgal, N., Magan, N., & Nychas, G. J. E. (2008). Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134(2), 902–907. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.06.038>
- Parish, M., Wollan, D., & Paul, R. (2005). Micro-Oxygenation – a Review. *Internet Journal of Viticulture and Enology*, 1–10.
- Patricio, I., Canas, S., & Belchior, A. P. (2005). Effect of brandies agitation on the kinetics of extraction/oxidation and diffusion of wood extractable compounds in experimental model. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 20(1), 01–15.
- Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., & Vyvyan, J. (2010). Introdução à espectroscopia. In *Cengage Learning* (pp. 399–500). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700048>
- Peres, T. (2002). Noções básicas de cromatografia. *Revista Biológica, São Paulo*, 227–229. http://200.144.6.109/docs/bio/v64_2/peres.pdf
- Philips, R. J. (1989). Qualitative and Quantitative analysis. In K. J. Hyver & P. Sandra (Eds.), *High Resolution Gas Chromatography* (3rd ed.). Hewlett-Packard Co.
- Portaria 57/2021 de 12 de Março do Ministério da Agricultura.
- Puech, J. L., Leauté, R., Clot, G., Nomdedeu, L., & Mondié, H. (1984). Évolution de divers constituants volatils et phénoliques des eaux-de-vie de cognac au cours de leur vieillissement. *Sciences Des Aliments*, 4, 65–80.
- Puech, J. L., Robert, A., & Mouttet, B. (1989). Evolution of Oak Wood Lignin Subjected to Flash Hydrolysis. *Holzforchung*, 43(4), 235–238.

<https://doi.org/10.1515/hfsg.1989.43.4.235>

- Puech, J. L., Sarni, F., Labidi, A., Mouttet, B., & Robert, A. (1990). Delignification of oak wood with an ethanol-water solution in a flow-through reactor. *Holzforschung*, 44(5), 367–371. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1990.44.5.367>
- Quesada Granados, J., Merelo Guervós, J. J., Oliveras López, M. J., González Peñalver, J., Olalla Herrera, M., Blanca Herrera, R., & López Martínez, M. C. (2002). Application of artificial aging techniques to samples of rum and comparison with traditionally aged rums by analysis with artificial neural nets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1470–1477. <https://doi.org/10.1021/jf010889i>
- Reazin, G. H. (1983). Chemical analysis of whisky maturation. In Piggott J. R. (Ed.), *Flavour of distilled beverages: origin and development* (pp. 225–240). Ellis Horwood Limited.
- Reazin, G. H., Baldwin, S., Scales, H. S., Washington, H. W., & Andreasen, A. A. (1976). Determination of the Congeners Produced from Ethanol During Whisky Maturation. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 59(4), 770–776. <https://doi.org/10.1093/jaoac/59.4.770>
- Regulamento (UE) n° 2019/787 de 17 de Abril do Parlamento Europeu e do Conselho, Pub. L. No. Jornal Oficial da União Europeia (2019).
- Résolution OENO 3/2005. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2005.
- Résolution OENO 4/2005. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2005.
- Revi, M., Badeka, A., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine. *Food Chemistry*, 152, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.136>
- Rodríguez-Solana, R., Rodríguez-Freigedo, S., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., & Cortés-Diéguez, S. (2017). Optimisation of accelerated ageing of grape marc distillate on a micro-scale process using a Box–Behnken design: influence of oak origin, fragment size and toast level on the composition of the final product. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23, 5–14. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12249>
- Rodríguez Madrera, R., García Hevia, A., & Suárez Valles, B. (2013). Comparative study of two aging systems for cider brandy making. Changes in chemical composition. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.037>
- Skoog, West, Holler, & Crouch. (2006). Cromatografía Gasosa. In Thomson (Ed.), *Fundamentos de química analítica* (8th ed., p. 1026).
- Soares, B., Garcia, R., Freitas, A. M. C., & Cabrita, M. J. (2012). Phenolic compounds released from oak, cherry, chestnut and robinia chips into a synthetic wine: Influence of toasting level. *Ciencia e Técnica Vitivinícola*, 27(1), 17–26.
- Stone, H., Sidel, J. L., & Bloomquist, J. (1980). Quantitative Descriptive Analysis. In *Sensory Evaluation Practices* (Vol. 25, Issue 10, pp. 642–644). Food & Nutrition Press, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470385036.ch1f>
- Taloumi, T., & Makris, D. (2017). Accelerated Aging of the Traditional Greek Distillate Tsipouro Using Wooden Chips. Part I: Effect of Static Maceration vs. Ultrasonication on the Polyphenol Extraction and Antioxidant Activity. *Beverages*, 3, 5. <https://doi.org/10.3390/beverages3010005>
- Tsakiris, A., Kallithraka, S., & Kourkoutas, Y. (2014). Grape brandy production, composition and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 404–414. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6377>

- Ugliano, M. (2013). Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6125–6136. <https://doi.org/10.1021/jf400810v>
- Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C., & Moutounet, M. (1993). Ellagitannins and Lignins in Aging of Spirits in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1872–1879. <https://doi.org/10.1021/jf00035a013>
- Wang, S., Li, Y., Ren, J., Gu, P., Li, T., Wu, Y., Zhang, B., & Zhu, B. (2018). Comparison on evolution of volatile compounds and aroma attributes in different pH-adjusted fermented bog bilberry syrup wines during bottle-aging period. *Food Bioscience*, 22(January), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.003>
- Wu, Y., Zhu, B., Tu, C., Duan, C., & Pan, Q. (2011). Generation of volatile compounds in litchi wine during winemaking and short-term bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4923–4931. <https://doi.org/10.1021/jf2001876>

Anexos

Anexo I - Ficha de prova de aguardentes

EVN-SERVIÇO DE PROVA ORGANOLÉPTICA - Ficha de avaliação de aguardentes vínicas -2020

Provedor _____ Data ____ / ____ / ____

	AMOSTRAS									
CARACTERÍSTICAS (intensidade de 0 a 5)*										
COR										
Citrino										
Palha										
Dourado										
Topázio										
Esverdeado										
AROMA										
Alcool										
Frutado										
Floral										
Vanilina/baunilha										
Madeira										
Ranço (bom)										
Especiarias										
Caramelo										
Queimado/Torrado										
Frutos secos										
Fumo/Cinzas										
Café										
Adocicado										
Herbáceo										
Caudas										
Acetato Etilo/Cola/Verniz										
Borracha										
OUTROS										
SABOR										
Doce										
Macio										
Queimante										
Adstringência										
Aspereza										
Amargo										
Corpo										
Untuosidade										
Evolução										
Complexidade										
Aroma de boca										
Persistência										
OUTROS										
APRECIACÕES (Nota 1 a 20)										
Aroma										
Sabor										
Geral										

*1-muito fraca, 2-fraca, 3-média; 4-forte; 5 muito forte

Anexo II – Comunicação Oral

A comunicação oral foi realizada no âmbito do congresso CMR-International Conference on Multidisciplinary Research que aconteceu em Viseu nos dias 1 e 2 de julho de 2021. Complementarmente à comunicação oral, foi realizado um resumo publicado na revista Millenium (Journal of Education, Technologies, and Health):

Oral presentation in conference

Caldeira, I., Granja-Soares, J., Vitória, C., Anjos, O., Fernandes, T. A., Fargeton, L., Boissier, B., Catarino, S., Canas, S. (2021). Volatile phenols in aged wine spirits: role, contents and impact of ageing systems. CMR | International Conference on Multidisciplinary Research. 1 to 2 July. Polytechnic Institute of Viseu, Viseu, Portugal. Oral presentation by Ilda Caldeira.

Abstracts in international indexed jornal – other indexers

Caldeira, I., Granja-Soares, J., Vitória, C., Anjos, O., Fernandes, T. A., Fargeton, L., Boissier, B., Catarino, S., Canas, S. (2021). Volatile phenols in aged wine spirits: role, contents and impact of ageing systems. Millenium, 2(ed espec nº8), 89.



VOLATILE PHENOLS IN AGED WINE SPIRITS: ROLE, CONTENTS AND IMPACT OF AGEING SYSTEMS

Ilda Caldeira^{1,2}, Joana Granja-Soares³, Cláudia Vitória⁴, Ofélia Anjos^{5,6}, Tiago A. Fernandes^{7,8}, Laurent Fargeton⁹, Benjamin Boissier⁹, Sofia Catarino^{10,11}, Sara Canas^{1,2}

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Portugal;

²Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, Institute for Advanced Studies and Research, Universidade de Évora, Portugal

³Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal

⁴Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior, Portugal

⁵Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

⁶Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal

⁷Centro de Química Estrutural, Associação do Instituto Superior Técnico para a Investigação e Desenvolvimento (IST-ID), Universidade de Lisboa, Portugal;

⁸Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta, Portugal

⁹Vivelys, Domaine du Chapitre, France

¹⁰LEAF—Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Research Center, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal

¹¹Center of Physics and Engineering of Advanced Materials, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugal

Presenting author: Ilda Caldeira | ilda.caldeira@iniav.pt

The volatile phenols (eugenol, guaiacol, 4-methylguaiacol, syringol, 4-methylsyringol and 4-allylsyringol) are odorant compounds that may exist in aged wine spirits resulting from their contact with wooden barrels during the ageing process. These compounds, which are originated from wood lignin's, revealed an important sensory impact in aged wine spirits due to their low sensory thresholds and correlations with sensory attributes such as woody, toasted, smoke, which have a close relationship with the quality of these beverages. The wine spirits are traditionally aged in wooden barrels but the use of wood fragments, with or without micro-oxygenation, is a technological alternative that has been recently studied by our team with promising results. This work presents an overview of volatile phenols' amounts in wine spirits aged in wooden barrels during different ageing times and using two kinds of wood (chestnut versus oak). These compounds were quantified by GC-FID, after a previous extraction and concentration steps, and their identification was assessed by GC-MS. It is also examined the results and the impact of alternative technologies on the amounts of such compounds. The ANOVA results showed a significant effect of the ageing system and the wood botanical species on the volatile phenols contents.

Keywords: Volatile phenols; Aged spirits; Chestnut; Oak; Micro-oxygenation

Acknowledgments: The authors thank the financial support of projects Project CENTRO-04-3928-FEDER-000028 and POCI-01-0145-FEDER-027819.

Anexo III – Resumo para Póster

O resumo encontra-se no âmbito do XV Encontro de Química dos Alimentos que decorrerá no Funchal entre os dias 5-8 de setembro de 2021 e foi aceite para apresentação em forma póster.



FTIR-ATR, FT-RAMAN ad CG-FID assessment of discrimination of aged wine spirits under different conditions

Ofélia Anjos,^{1,2,3} Ilda Caldeira,^{4,5} Cláudia Vitória,⁶ Soraia I. Pedro,^{1,3} Tiago A. Fernandes,^{7,8} Laurent Fargeton,⁹ Benjamin Boissier,⁹ Sofia Catarino,^{10,11} Sara Canas,^{1,2}

¹ CEF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 1349-017 Lisboa, Portugal

² IPCB, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Quinta da Senhora de Mércules, 6001-909 Castelo Branco, Portugal

³ CBPBI, Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, 6001-909 Castelo Branco, Portugal

⁴ INIAV, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Quinta de Almoinha, Pólo de Dois Portos, 2565-191 Dois Portos, Portugal

⁵ MED, Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, Institute for Advanced Studies and Research, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, 7006-554 Évora, Portugal

⁶ Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior, 6201-556 Covilhã, Portugal

⁷ CQE, Centro de Química Estrutural, Associação do Instituto Superior Técnico para a Investigação e Desenvolvimento (IST-ID), Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal

⁸ DCeT, Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta, Rua da Escola Politécnica, 141-147, 1269-001 Lisboa, Portugal

⁹ LEAF, Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Research Center, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

¹⁰ CEFEMA—Center of Physics and Engineering of Advanced Materials, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa, Portugal

¹¹ Vivelys, Domaine du Chapitre, 34750 Villeneuve-les-Maguelone, France

Email: ofelia@ipcb.pt

Spectroscopic techniques namely Fourier transform infrared spectroscopic with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) and FT-RAMAN can be powerful tools to assess the quality of many different foods and beverages.^{1,2}

The aim of this work was to evaluate the performance of FTIR-ATR, FT-RAMAN and GC-FID to discriminate wine spirits aged with chestnut wood during one year in 250 L wooden barrels and in 50 L demijohns with staves combined with different micro-oxygenation levels.

Different approaches were used to evaluate the differences between the wine spirits resulting from the ageing modalities studied. The first one was the application of GC-FID for the quantification of odorant compounds in the wine spirits.³ The second one was the evaluation by spectroscopy techniques, specifically FTIR-ATR and FT-RAMAN.

GC-FID analysis was performed in a chromatograph (Agilent Technologies 6890N) equipped with fused silica capillary column of polyethylene glycol (HP-INNOWax, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 30 m, 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, under the chromatographic conditions described by Caldeira *et al.* (2021).³

FTIR-ATR spectra were acquired in a Bruker FTIR spectrometer (Alpha) with a resolution of 4 cm^{-1} in the wavelength region 4000-400 cm^{-1} , using a diamond single reflection attenuated total reflectance (ATR). All spectra were obtained with 32 scans. The FT-RAMAN spectra were acquired using a FT-RAMAN spectrometer (BRUKER, MultiRAM) with a spectral resolution of 4 cm^{-1} , scanner velocity of 5 KHZ and 100 scans per sample. All spectra (from FTIR-ATR and FT-RAMAN) were collected at a constant room temperature of 20 °C.

ANOVA results showed a significant effect of the ageing modality on the contents of volatile compounds, namely linalool, acetic acid, syringol and ethyl acetate. Regarding the principal component analyses performed with the results from the three methodologies, it was found a clear separation of the aged spirit samples based on the technology used in the ageing process (Figure 1).

XV ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS

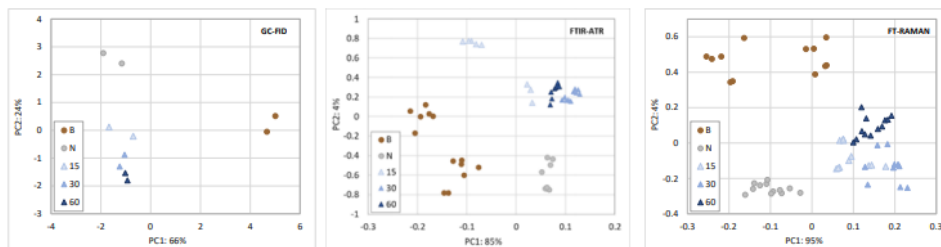


Figure 1: Principal component analysis of GC-FID, FTIR-ATR and FT-RAMAN of wine spirits samples from different ageing modalities

Great differentiation of the volatile composition between samples from alternative ageing processes and those from the traditional process in wooden barrels was observed. This differentiation was also found by the spectroscopy techniques applied, with more accurate results observed for RAMAN. These outcomes show that FTIR-ATR and FT-RAMAN are powerful techniques for the quality control of wine spirits, since they allow a quick discrimination between samples produced with different methodologies.

Acknowledgements: This work was also supported by National Funds through FCT—Foundation for Science and Technology under the Projects; UIDB/05183/2020 [MED]; UIDP/00100/2020 [CQE]; DL 57/2016/CP1382/CT0025 [LEAF].

Funding: The authors thank the financial support of the Project POCI-01-0145-FEDER-027819 and Forest Research Centre (CEF) a unit funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P. (FCT), Portugal

1. O. Anjos, A.J.A. Santos, L.M. Estevinho, I. Caldeira, *Food. Chem.* (2016) 205:28–35.
2. O. Anjos, M.G. Campos, P.C. Ruiz, P. Antunes, *Food. Chem.* (2015) 169:218–223.
3. I. Caldeira, C. Vitória, O. Anjos, T.A. Fernandes, E. Gallardo, L. Fargeton, B. Boissier, S. Catarino, S. Canas, *Appl. Sci.* (2021) 11: 3991.

Anexo IV – Artigo Científico

JCR Journals

Caldeira, I.; Vitória, C.; Anjos, O.; Fernandes, T.A.; Gallardo, E.; Fargeton, L.; Boissier, B.; Catarino, S.; Canas, S. Wine Spirit Ageing with Chestnut Staves under Different Micro-Oxygenation Strategies: Effects on the Volatile Compounds and Sensory Profile. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3991. <https://doi.org/10.3390/app11093991>



Article

Wine Spirit Ageing with Chestnut Staves under Different Micro-Oxygenation Strategies: Effects on the Volatile Compounds and Sensory Profile

Ilda Caldeira ^{1,2,*}, Cláudia Vitória ³, Ofélia Anjos ^{4,5,6}, Tiago A. Fernandes ^{7,8}, Eugénia Gallardo ⁹, Laurent Fargeton ¹⁰, Benjamin Boissier ¹⁰, Sofia Catarino ^{11,12} and Sara Canas ^{1,2}



Citation: Caldeira, I.; Vitória, C.; Anjos, O.; Fernandes, T.A.; Gallardo, E.; Fargeton, L.; Boissier, B.; Catarino, S.; Canas, S. Wine Spirit Ageing with Chestnut Staves under Different Micro-Oxygenation Strategies: Effects on the Volatile Compounds and Sensory Profile. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3991. <https://doi.org/10.3390/app11093991>

Academic Editor:
Alessandro Genovesi

Received: 26 March 2021

Accepted: 25 April 2021

Published: 28 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Quinta de Almoíña, Pólo de Dois Portos, 2565-191 Dois Portos, Portugal; sara.canas@iniav.pt
 - ² MED—Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, Instituto de Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal
 - ³ Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior, 6201-556 Covilhã, Portugal; adriana-1998@hotmail.com
 - ⁴ Instituto Politécnico de Castelo Branco, Quinta da Senhora de Mércules, 6001-909 Castelo Branco, Portugal; ofelia@ipcb.pt
 - ⁵ CEF, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal
 - ⁶ Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, 6001-909 Castelo Branco, Portugal
 - ⁷ CQE, Centro de Química Estrutural, Associação do Instituto Superior Técnico para a Investigação e Desenvolvimento (IST-ID), Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal; tiago.a.fernandes@tecnico.ulisboa.pt
 - ⁸ DceT—Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta, Rua da Escola Politécnica, 141-147, 1269-001 Lisboa, Portugal
 - ⁹ CICS-UBI, Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 6201-556 Covilhã, Portugal; egallardo@fcsaude.ubi.pt
 - ¹⁰ Vivelys, Domaine du Chapitre, 34750 Villeneuve-les-Maguelone, France; laurent.fargeton@vivelys.com (L.F.); benjamin.boissier@vivelys.com (B.B.)
 - ¹¹ LEAF—Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Research Center, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal; sofiacatarino@isa.ulisboa.pt
 - ¹² CEFEMA—Center of Physics and Engineering of Advanced Materials, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa, Portugal
- * Correspondence: ilda.caldeira@iniav.pt

Abstract: The purpose of this work is to evaluate the wine spirit aged by an alternative process (staves combined with different micro-oxygenation levels) and its comparison with the traditional process (wooden barrels). This evaluation was made by analyzing the volatile compounds and sensory profile of the spirits during 365 days of ageing. The findings confirmed the role played by oxygen in the volatile profile of aged wine spirits. Samples of alternative ageing modalities were well distinguished from those of wooden barrels based on the volatile profile, namely on the concentrations of several volatile phenols. From a sensory point of view, the results are promising with high overall consistency scores obtained from samples of alternative ageing process modalities.

Keywords: wine spirit; chestnut; micro-oxygenation; volatile compounds; sensory profile

1. Introduction

The traditional process for ageing wine spirits consists of keeping them, after the distillation, in wooden barrels for a longer or shorter period of time, from several months to several years. Traditionally, the oak wood, especially from the French region of Limousin (mostly *Quercus robur* L.), is used for making the barrels for the ageing of wine spirits [1]. Nevertheless, the results from several studies [2] revealed the suitability of chestnut barrels for the ageing of wine spirits.

from TCI (Zwijndrecht, Belgium), ethyl butyrate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). 2-Methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol and acetaldehyde were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). The proportion of isomers *cis* and *trans* from β -methyl- γ -octalactone were determined before being used for calibration.

2.2. Wine Spirit Samples and Experimental Design

The same wine spirit obtained by column distillation in Lourinhã region (Portugal), at a Portuguese winery (Adega Cooperativa da Lourinhã) was used to fill several vessels corresponding to five modalities with different ageing conditions:

- CB—250 L wooden barrel of chestnut wood;
- CO15—50 L glass demijohns with chestnut staves and micro-oxygenation with a flow rate of 2 mL/L/month during the first 15 days followed by 0.6 mL/L/month until 365 days;
- CO30—50 L demijohns with chestnut staves and submitted to a micro-oxygenation with a flow rate of 2 mL/L/month during the first 30 days followed by 0.6 mL/L/month until 365 days;
- CO60—50 L glass demijohns with chestnut staves and submitted to a micro-oxygenation with a flow rate of 2 mL/L/month during the first 60 days followed by 0.6 mL/L/month until 365 days;
- CN—50 L demijohns with chestnut staves and nitrogen application with a flow rate of 20 mL/L/month (nitrogen modality).

The dissolved oxygen content in each modality was controlled over the time, as described previously [24] and the values are shown in Figure 1.

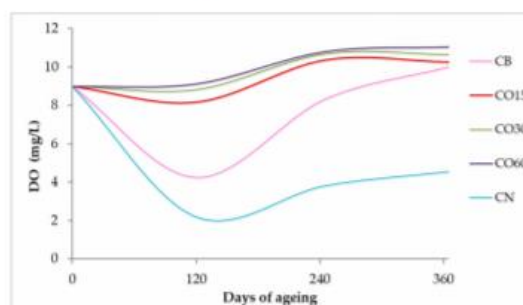


Figure 1. Average dissolved oxygen content in each ageing modality, during the ageing period (adapted from [24]).

Two replicates of each modality were carried out and the chestnut wooden barrel and staves were submitted to medium plus toasting at the cooperage (J. M. Gonçalves, Palaçoulo, Portugal). The number of staves (50 cm length \times 5 cm width \times 1.8 cm thickness) introduced into the demijohns was planned in order to mimic the surface area to volume ratio of a 250 L barrel (85 cm²/L).

The supply of pure oxygen (X50S Food, Gasin, Perafita, Portugal) in the 50 L demijohns was done through a multiple diffuser micro-oxygenator (VISIO 6, Vivelys, Viileneuve-lès-Maguelone, France) with ceramic diffusers, at different flow rates according to the ageing modality (O). Pure nitrogen (N) (X50S Food, Gasin, Perafita, Portugal) was supplied during the ageing experiment through a specific apparatus (Gasim, Perafita, Portugal).

All the ten experimental units, located in the cellar of Adega Cooperativa da Lourinhã in similar environmental conditions, were sampled at a middle height and over specific time periods (at 8, 60, 180, 270 and 365 days of ageing) in order to monitor the target volatile compounds: acetaldehyde, linalool, acetic acid and syringol.

octalactone, 4-propylguaiaicol, 4-methyl-syringol, 4-allyl-syringol were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany); 4-ethylguaiaicol, DL-malic acid diethyl ester were purchased

At the experiment's conclusion (365 days), the samples were taken for odorant profile screening and sensory evaluation of the wine spirits.

At the beginning of the experiment, a sample of the unaged wine spirit was also taken, and the target and odorant compounds as well as the sensory characteristics were determined. This sample was coded as a control spirit.

2.3. Analysis of Odorant Compounds of Wine Spirits

At the end of the ageing experiment, the analysis was focused on the volatile compounds previously assigned as odorant compounds [11]. These odorant compounds included some major volatile compounds, such as 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-propanol, which were quantified by GC-FID in the wine spirit distillate, and several minor volatile compounds that were analysed by GC-FID after previous steps of extraction and concentration.

During the ageing experiment, four target volatile compounds (acetaldehyde, acetic acid, linalool, and syringol) were analyzed.

2.3.1. Quantification of Major Volatile Compounds by GC-FID

Acetaldehyde, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, and ethyl acetate were determined by GC-FID, following a previously validated method [26]. The samples of 10 mL of each wine spirit distillate, previously added of 1 mL of 5-methyl-2-pentanol (internal standard) were manually injected (1 μ L) on Focus GC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) chromatograph coupled to a flame ionization detector (FID) and equipped with fused silica capillary column of polyethylene glycol (DB-Wax J & W Scientific, Folsom, CA, USA), 60 m, 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness. The chromatographic conditions were: injector (200 °C) detector (250 °C); carrier gas hydrogen (3.4 mL/min and split ratio 1:6); oven temperature program: 10 °C/min from 35 °C (8 min isothermal) until 200 °C and held at this temperature for 9 min.

The quantification was done by analyzing hydroalcoholic solutions of the standards in similar conditions.

2.3.2. Quantification of Minor Volatile Compounds by GC-FID

Previous to the analysis by GC-FID, a volume of 100 mL of each wine spirit added of 1.6 mL of 5-methyl-2-hexanol as an internal standard (IS, 81.0 mg/L 50% ethanol solution) and 0.5 mL of 3,4-dimethylphenol (IS, 100 mg/L in ethanol) was extracted with dichloromethane (30, 10 and 10 mL) and concentrated on a rotary evaporator (Büchli rotavapor R114 at 42 ± 0.5 °C, without vacuum) until a volume of about 0.25 mL according to the method previously validated [27]. Each extract was analyzed under the following chromatographic conditions: Agilent Technologies 6890 Series gas chromatograph (Wilmington, DE, USA) coupled to a flame ionization detector (FID) and equipped with a fused silica capillary column of polyethylene glycol (INNOWax of J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 30 m, 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness; injection volume of 0.8 μ L; injector and detector temperatures (250 °C); carrier gas hydrogen (2.4 mL/min and split ratio 1:25); oven temperature program: 3.5 °C/min from 35 °C (6 min isothermal) to 55 °C, 7.5 °C/min to 130 °C, 5 °C/min to 210 °C (30 min isothermal). For each sample, the extractions were done in duplicate, and each extract was analyzed in triplicate.

The quantification of minor volatile compounds (acetic acid, linalool, guaiacol, 4-methylguaiacol, eugenol, syringol, 4-methylsyringol, vanillin, acetovanillone, ethyl isobutyrate, ethyl butanoate, isoamyl acetate, trans-2-hexenol, ethyl octanoate, furfural, 5-methylfurfural, butanoic acid, 2-methylbutanoic acid, hexanoic acid, 2-phenylethanol, 4-ethylguaiacol, dodecanoic acid, 5-hydroxymethylfurfural, 4-allylsyringol) was based on calibration curves, which were established by the extraction of hydroalcoholic solutions of standards and their chromatographic analysis under similar conditions.

2.3.3. Analysis by GC/MS

The compounds identification was done by injection of 0.4 μL of each sample on a GC-MS equipment (Magnum, Finnigan Mat, San Jose, CA, USA) with a polyethylene glycol fused silica capillary column (HP-INNOWax of J&W Scientific, Folsom, CA, USA, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μm thick), employing helium as carrier gas at 83 kPa pressure; the injector worked with split ratio 1:60 at 250 $^{\circ}\text{C}$; the transfer line was also at 250 $^{\circ}\text{C}$; the oven temperature program: 3.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ of 35 $^{\circ}\text{C}$ (6 isothermal minutes) to 55 $^{\circ}\text{C}$, 7.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 130 $^{\circ}\text{C}$, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 210 $^{\circ}\text{C}$ and kept at this temperature for 30 min. The mass spectrometer worked in the electron impact mode at 70 eV and scanned the mass range of m/z 20–340.

The identities of volatile compounds were carefully confirmed by assessment of Kovats retention index (KI) and by MS fragmentation pattern with those of reference compounds and with mass spectra in the NIST libraries.

2.4. Sensory Evaluation of Wine Spirits

The aged wine spirits samples were assessed by a group of eight tasters according to the procedure previously described [25].

The sensory attributes, previously generated, included sixteen orthonasal aroma attributes (alcohol, fruity, vanilla, wood, rancid, spicy, caramel, toasted, dried fruits, smoke, coffee, sweet, green, tails, glue, and caoutchouc) and twelve gustatory attributes (sweetness, smooth, burning, astringency, roughness, bitter, body, unctuous, flavor complexity, flavor evolution, retronasal aroma, and persistence).

The aged wine spirits samples were diluted with water fifteen days before the tasting session to reduce the ethanol content to 40% v/v , and they were kept in the dark at 20 $^{\circ}\text{C}$ until analysis.

The tasting session was carried out in the Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) tasting room with individual white boots, and 30 mL of each sample was assessed in standard wine-tasting glasses (ISO 3591) [28]. The sensory evaluation was done in the morning between 10:00 a.m. and 12:00 a.m., and the tasters evaluated the samples, coded with three random digits, and presented in each session in balanced order to eliminate first-order carryover effects [29].

The tasters were asked to evaluate the sensory attributes with a structured scale (0-no perception to 5-highest perception) and to rate the overall quality of the wine spirits, from 0 to 20. The sensory data were collected by the Tastel software (ABT Informatique, Rouvroy-sur-Marne, France).

2.5. Statistical Analysis of Data

The analytical and sensory data determined in the aged wine spirits samples after 365 days of ageing were submitted to a one-way analysis of variance (ANOVA) to verify the influence of the micro-oxygenation modality on the sensory and volatile composition.

Similar analysis was done at each sampling time with the data of target compounds. The variance homogeneity was assessed (Cochran test); when a statistically significant effect was found ($p < 0.05$) the least significant difference (LSD) test was applied to compare the means.

Heatmaps analysis was performed, firstly, with the volatile compounds and thereafter with the sensory attributes presenting significant effects with the ANOVA. The r value of Pearson correlation was determined for both group of data and correlated using the clustering analysis. On the heatmaps, different colours represent the positive r and negative one.

For all above-mentioned analysis, Statistica version 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) was used.

3. Results and Discussion

In this study, the effects of different micro-oxygenation strategies on the content of odorant compounds, that is the volatile compounds previously identified as key odorants




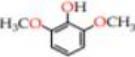
in aged wine spirits [11], were evaluated. Additionally, acetaldehyde and ethyl acetate were also quantified.

A sensory assessment of control and aged spirits was also carried out.

3.1. Evolution of Target Volatile Compounds over the Ageing Experiment

Table 1 exhibits the results of the target volatile compounds over the ageing time and the corresponding graphical representation to clearly show the behavior over the time. These compounds were chosen as targets from a wide set of volatile compounds in wine spirits [1] because they have different origins and different behaviors during the ageing time according to previous research made on alternative ageing technologies without micro-oxygenation [8,10].

Table 1. Concentration (mg/L) of target volatile compounds quantified in the wine spirits sampled from different ageing modalities over the time (8, 60, 180, 270 and 365 days) and ANOVA summary.

		Ageing Time (days)					
		0	8	60	180	270	365
Significance level		-	ns	ns	ns	ns	0.008
Linalool (mg/L) 	CB		0.30	0.27	0.22	0.20	0.14 ^a
	CO15		0.28	0.27	0.24	0.21	0.17 ^a
	CO30	0.31	0.29	0.26	0.26	0.23	0.25 ^b
	CO60		0.27	0.24	0.23	0.19	0.25 ^b
	CN		0.28	0.26	0.24	0.20	0.16 ^a
Significance level		-	ns	ns	0.016	0.001	0.013
Acetaldehyde (mg/L) 	CB		40.03	61.05	58.82 ^a	43.99 ^a	56.64 ^{a,b}
	CO15		40.90	51.59	64.84 ^b	59.18 ^b	66.01 ^c
	CO30	28.90	43.51	56.75	65.66 ^b	57.39 ^b	60.09 ^{b,c}
	CO60		46.99	67.93	66.20 ^b	56.80 ^b	59.68 ^b
	CN		43.51	61.05	58.91 ^a	43.10 ^a	51.43 ^a
Significance level		-	0.018	0.002	0.000	0.000	0.000
Acetic acid (mg/L) 	CB		153.21 ^b	278.62 ^b	361.03 ^c	381.05 ^c	427.14 ^c
	CO15		141.14 ^a	177.73 ^a	243.14 ^b	257.36 ^b	246.85 ^b
	CO30	84.84	136.65 ^a	222.63 ^{a,b}	227.29 ^b	228.15 ^{a,b}	245.20 ^b
	CO60		141.61 ^a	197.79 ^{a,b}	235.89 ^b	247.97 ^b	254.33 ^b
	CN		133.65 ^a	195.48 ^{a,b}	205.58 ^a	200.83 ^a	218.29 ^a
Significance level		-	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
Syringol (mg/L) 	CB		0.14 ^a	0.22 ^a	0.24 ^a	0.27 ^a	0.28 ^a
	CO15		0.27 ^b	1.03 ^b	1.46 ^b	1.50 ^b	1.39 ^b
	CO30	0.00	0.25 ^b	1.02 ^b	1.42 ^b	1.37 ^b	1.43 ^b
	CO60		0.27 ^b	1.04 ^b	1.39 ^b	1.42 ^b	1.48 ^b
	CN		0.23 ^b	0.93 ^b	1.34 ^b	1.38 ^b	1.30 ^b

For each compound and for each ageing time, means within the same column followed by different uppercase letters (^a, ^b, ^c) are significantly different ($p < 0.05$).

Linalool, a terpenic alcohol proceeding from the grapes [30], is normally present in unaged wine spirits, as can be observed in Table 1, and it is usually linked to a floral, violet odor [11]. The linalool amount of 0.31 mg/L in the control wine spirit sample is according with the values range (0.17–0.50 mg/L) found in other wine spirits [10,31]. Conversely, it is lower than the amounts found in distillates made from Muscat wines [32], as the result of high levels of this compound in Muscat grapes [30]. In the present work, the linalool amount was not affected by the MOX strategies until 270 days of ageing. Only at the end of the ageing experiment (365 days) were significantly higher amounts observed in the spirits produced with CO30 and CO60 MOX. The increase in linalool concentration has been ascribed by several authors to the availability of different precursors capable of generating

this alcohol during ageing, particularly glycosidic precursors [33] and terpene diols [34]. The acidic hydrolysis of terpene glycosides result in a molecular rearrangement of the monoterpenols, which are then converted into other compounds such as linalool [35,36]. The higher concentration of oxygen in these MOX modalities (CO30 and CO60) resulted in an increase of electron-deficient oxygen species, such as aldehydes and carboxylic acids [24], contributes to reduce the pH of the medium, and may lead to the degradation of terpene glycosides. A slight decrease over the time of the linalool was observed in all the other modalities. A similar decrease was pointed out during an ageing experiment of two years [10]. The non-saturation characteristic of the double bond relates to the capability to participate in addition reactions, which is enabled by the π bond's weak energy. The cyclization product of monoterpenes catalyzed in acidic medium, is well known and can produce the two cineoles, by dehydration and direct cyclization or by the production of α -terpineol [36]. On the other hand, the high electronic density at the level of a double bond, as well as the accessibility of electrons π , means that electrophilic reagents (H^+ , R^+ , among others) would be the primary cause of attacks. Due to its own reactivity, the double bond is a weak point in the carbon chain, and certain reactions, such as oxidation reactions, can lead to a rupture between two double bonded carbons. The linalool concentration presented in freshly distilled wine spirits supposed to be consumed over time, as there is no way to form it in the reaction mixture, given that primarily sources of terpenes are the grapes skins and pulp [35,37,38]. Our findings for this compound might suggest further studies to determine whether it can be used as a marker of the authenticity of the wine distillate, as well as of its ageing time, since the longer it ages, the less linalool in its free state should be present.

Acetaldehyde, which is linked to a fruity note [13], was present in the unaged wine spirit (Table 1) with an amount of 28.9 mg/L. Indeed, acetaldehyde is a major volatile compound that is produced by yeasts during the wine fermentation process and recovered in the distillate [1], and a by-product of ethanol oxidation metabolism. During the ageing experiment its amount increased over time in all modalities with a slight decrease between 180 and 270 days of ageing. In the first two sampling times (8 and 60 days) there was no significant differences between the five ageing modalities. However, at 180, 270, and 365 days, significant differences between the acetaldehyde concentration in the wine spirits resulting from several ageing modalities was detected (Table 1). The highest amounts were found in wine spirits produced with MOX (CO15, CO30 and CO60) and the lowest ones were found in the wine spirits aged in wooden barrels and with nitrogen. This behavior was expected because the presence of acetaldehyde is related to ethanol oxidation; in more oxidative environments, its higher concentration is not surprising. At the last sampling time, it was possible to discriminate the wine spirit samples proceeding from different alternative modalities based on the acetaldehyde amounts, which were lower in the samples from the nitrogen modality (CN) and higher in CO15 samples. The amount of acetaldehyde found in micro-oxygenation modalities samples should be closely monitored. However, due to its high reactivity even in mild conditions, it is expected that the presence of acetaldehyde will decrease over time. Its reactivity is due to the fact that it has a trigonal carbon electrophile which is attacked by nucleophiles for the formation of a tetrahedral products or intermediates. The most important trigonal electrophiles found in wine spirits include carbonyl groups, which are classified as follows: aldehydes > ketones > esters > carboxylate ions. This order is easy to understand. The aldehyde ΔE_H has the lowest activation energy for disrupting π stabilization, whereas the carboxylate ion has the highest [39].

Acetic acid derives from the wine distillate, from the oxidation of ethanol via acetaldehyde, and from the acetyl groups found in the wood xylans, an important type of hemicelluloses [40]. Acetic acid is related to vinegar aroma [11,12] and existed in the unaged wine spirit (Table 1). Its concentration increased over the ageing time in accordance with other works [10,14,41,42]; which is associated with ethanol oxidation during ageing [43]. Nevertheless, significant differences in the acetic acid amounts were verified

in the wine spirits originated from different ageing modalities. The highest amounts were determined in the samples aged in the wooden barrels while the lowest were determined in samples from nitrogen modality (CN), confirming that its origin is linked to the oxidation of ethanol and acetaldehyde. These results pointed out the oxygen importance in the acetic acid formation and its increase during the ageing process.

Indeed, according to previous studies, acetaldehyde rates are high in very old aged spirits [14] or very old aged whiskies as result of ethanol oxidation [15], and acetaldehyde oxidation into acetic acid. Esterification between acetic acid and ethanol has been verified by ethyl acetate formation [15]; therefore, ethyl acetate quantification in wine spirits samples at the end of ageing experiment was made (Table 2). The results revealed slightly higher amounts of ethyl acetate in samples aged in wooden barrels and the lowest occurred in the nitrogen modality (CN), while MOX samples presented intermediate values, in accordance with results for acetic acid. However, only the CB modality showed higher concentration of ethyl acetate than the unaged wine spirit, suggesting that ethyl acetate hydrolysis occurred in MOX and CN modalities (Figure S1-Supplementar material).

Table 2. Concentration (mg/L) of odorant compounds quantified in wine spirits sampled from different ageing modalities at the end of the ageing experiment (365 days) and the summary of one-way ANOVA.

Odorant Compound	Significance Level	Control	Aged Wine Spirits after 365 Days of Ageing Modality				
			CB	CO15	CO30	CO60	CN
Isobutyl acetate	0.002	2.36	1.81 ^b	0.55 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	1.34 ^b
Ethyl hexanoate	0.009	1.20	1.89 ^c	1.72 ^b	1.72 ^b	1.80 ^{b,c}	1.58 ^a
Guaiacol	0.001	0.00	0.11 ^a	0.51 ^b	0.45 ^b	0.46 ^b	0.48 ^b
4-Methylguaiacol	0.004	0.00	0.05 ^a	0.31 ^b	0.28 ^b	0.25 ^b	0.28 ^b
Eugenol	0.021	0.00	0.33 ^c	0.28 ^{a,b}	0.30 ^{b,c}	0.28 ^{a,b}	0.23 ^a
4-Methylsyringol	0.000	0.00	0.36 ^a	1.24 ^c	1.24 ^c	1.26 ^c	1.09 ^b
Vanillin	0.014	0.00	7.74 ^b	7.52 ^b	7.14 ^b	8.21 ^b	4.97 ^a
Acetovanillone	0.003	0.00	0.34 ^a	0.80 ^{b,c}	0.81 ^{b,c}	0.97 ^c	0.77 ^b
Ethyl acetate	0.003	459.88	472.54 ^c	389.74 ^b	374.85 ^{a,b}	382.28 ^b	335.22 ^a

For each compound of aged wine spirit samples, means within the same row followed by different uppercase letters (^a, ^b, ^c) are significantly different ($p < 0.05$).

The different amounts of oxygen in the CN and MOX modalities (Figure 1) could explain the differences in acetaldehyde as well. The acetic acid differences between barrels and the other modalities can be related to differences in wood extraction. Thus, further research is needed to understand these differences.

Syringol, which is associated with odor notes of wood, smoke [11], is absent on unaged spirit (Table 1), as observed in other works [8,10]. Its presence in aged wine spirits has been assigned to wood lignin degradation [44]. Its amount increased over the time but the kinetics are quite different according to the ageing modalities (Table 1). In fact, its concentration was always higher in wine spirits proceeding from the MOX modalities (CO15, CO30, CO60) and nitrogen modality (CN) than in those resulting from the wooden barrels (CB). Similar results were previously obtained; with high concentration of syringol found in spirits aged with alternative ageing systems without [10] and with micro-oxygenation [25] in comparison with those aged in wooden barrels. These findings lead us to believe that the degradation of wood lignin can increase in the MOX modalities giving rise to higher concentration of syringol in the beverage. Additionally, since lignins are degraded in contact with alcoholic beverages [45,46], these results suggest a more intense lignin extraction and degradation in MOX and N modalities. Nevertheless, contribution of wood variability and/or the extraction rate of syringol to such a variation should not be excluded [10,47].

3.2. Odorant Compounds of Aged Wine Spirits

At the end of the ageing experiment (365 days), the odorant compounds of the aged wine spirits were quantified. The ethyl isovalerate is not quantifiable and the

ethyl-2-methylbutanoate, β -methyl- γ -octalactone, diethyl malate, 4-propylguaiacol and 4-ethylphenol were not detected in these samples. The ANOVA results (Table 2) pointed out a significant effect of the ageing modality on the contents of twelve compounds, which include the four previously mentioned and discussed (linalool, acetic acid, syringol and ethyl acetate). On the other hand, the concentrations of other 17 odorant compounds were not affected (Table S1-Supplementar material).

Regarding isobutyl acetate, which is related to fruity notes [48], higher concentrations were found in samples from wooden barrels (CB) and from nitrogen modality (CN) while in MOX samples the amounts were lower or quite null. These results are not in accordance with those reported by Granja-Soares et al. [25], whose found the highest values of this ester in wine spirits aged through an alternative ageing system (staves combined with micro-oxygenation using a single flow of oxygen; 2 mL/L/month) in comparison with wooden barrels. Since esters are roughly as reactive as carboxylic acids, this reaction is highly reversible. Higher isobutyl acetate concentrations need excess concentration of acetic acid, which was not found in MOX samples. According to Le Chatelier's theory, higher concentration of acetic acid would shift the equilibrium toward ester production, which is confirmed by higher concentrations of isobutyl acetate and acetic acid in samples from wooden barrels (CB) at the conclusion of the ageing experiment (365 days). The concentrations of isobutyl acetate in CO30 and CO60 MOX samples may be indicating that the wide availability of oxygen induces significant chemical content variation over the time, resulting in an increase of electrophilic species, among these phenolic aldehydes and acids such as: syringaldehyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde, ellagic, and syringic acid, previously confirmed for the same MOX samples [24]. The presence of these substrates, particularly at higher concentrations, can contribute to the disappearance of isobutyl acetate and other acetates, due to: (i) nucleophilic acyl substitution; (ii) deacetylation processes; (iii) competition with its formation by consumption of direct or indirect building blocks required for the formation of isobutyl acetate (acetic acid, isobutyl alcohol, or pyruvic acid) by reactions with lower activation energies in order to form other, more energetically viable species. In the case of ethyl hexanoate, which is also related with fruity notes [48], the highest concentrations were found in wine spirits from the barrels (CB) and the lowest were found in wine spirits from CN modality. The MOX modalities provided intermediate values. In a previous work [25], the amount of this ester was not influenced by the ageing system, likely due to the higher flow rate of oxygen used.

Guaiacol and 4-methylguaiacol, which are usually related to smoky odor notes [49], behaved similarly to syringol, showing the lowest concentrations in the barrel samples and the highest levels in the other samples (MOX modalities and nitrogen modality). Also for 4-methylsyringol, which is associated with smoke and burned odor notes [11], the lowest concentrations were found in barrel samples, and the highest values were determined in the samples from MOX modalities. The modality with nitrogen (CN) showed an intermediate concentration of 4-methylsyringol.

The behavior of eugenol (4-allylguaiacol), which is well correlated with spicy odor notes [11], was rather different with high concentrations occurring in wine spirit samples from barrels and low concentrations in those obtained under nitrogen modality (CN). The wine spirit samples proceeding from MOX modalities exhibited intermediate values of eugenol.

Some of these results are in agreement with those obtained in previous research work [25] which found significantly higher concentrations of guaiacol, methylguaiacol, 4-methylsyringol, and syringol in wine spirits produced using alternative ageing system (staves and micro-oxygenation) in comparison with those produced by the traditional process (wooden barrels).

The vanillin amounts, generally well correlated with vanilla attribute in aged wine spirits [11], were significantly influenced by the ageing modalities (Table 2) with the lowest amounts on the samples produced under nitrogen (CN). These results confirmed the importance of oxygen in the pathway of vanillin formation during the wood contact. The

vanillin is usually available in the wood as result of thermal lignin degradation during the cooperage manufacturing of the barrels or staves, but their presence in wine spirits results from wood extraction, lignin degradation by hydroalcoholysis and by oxidation of coniferaldehyde [4,14].

The acetovanillone, which also results from lignin degradation [4] and also presents vanilla-like odor notes [50] was also significantly influenced by the ageing modalities (Table 2) with the lowest amount in wine spirits aged in wooden barrels and the highest amounts were observed in wine spirits from CO60 modality. The samples from other modalities exhibited intermediate values of this compound.

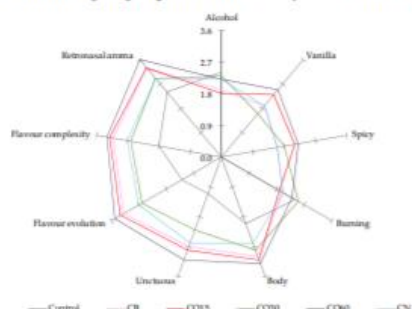
Although the MOX modalities (CO15, CO30 and CO60) were designed to reproduce and accelerate reactions occurring in wooden barrels (CB), the obtained results suggest that the reactions were not the same. These differences may be due to several factors that will need to be further explored. As predicted, the dissolved oxygen levels in MOX modalities were higher than those observed in the wooden barrel (Figure 1). Given that the oxygen dissolved in a wooden barrel is always the result of a balance between the oxygen that passes through the wood and the oxygen that is consumed in the reactions [51], lower levels of dissolved oxygen in the CB than in MOX modalities may indicate a higher consumption or a lower oxygen entry through the barrel. Some results, such as those of acetaldehyde (in a lower content in spirits from wooden barrels), suggest a lower availability of oxygen in the wooden barrels and its lower consumption in oxidation reactions. Nevertheless, other results such as the acetic acid concentration, which is dependent on acetaldehyde oxidation and its extraction from the wood, and whose contents have often been higher in wine spirits from the wooden barrel, suggest a potential higher consumption of oxygen in the barrels, as well as greater extraction. On the other hand, the results of several volatile phenols and acetovanillone seem to indicate higher extraction in wine spirits aged in the alternative modalities. The extraction of compounds from wooden barrels results from the impregnation of the liquid in the staves [52], which is governed and influenced by several driving forces [51]. In our experimental design, in which the arrangement of the staves in relation to the liquid is very different in the barrels and in the demijohns, it could be assumed that the impregnation took place in a different way and contributed to the observed differences.

3.3. Sensory Results

Concerning the sensory outcomes, the ANOVA output showed that the ageing modalities had a major effect on nine sensory attributes. The results for each ageing modality and control sample (without ageing) are shown at Table 3, combined with the equivalent spider graphics in order to better illustrate the differences between modalities. Other sensory attributes (fruity, wood, rancid, caramel, toasted, dried fruits, smoke, coffee, sweet, green, tails, glue and caoutchouc, sweetness, smooth, astringency, roughness, bitter, and persistence) were not significantly affected by the ageing modality. Also, the overall quality of the aged wine spirits was significantly affected by the ageing modality.

The intensities of vanilla, spicy, unctuous, flavor evolution, flavor complexity, and retronasal aroma increased with ageing process in accordance with previous research [5] and were significantly higher in the wine spirits from CO60 modality, while the lowest values were detected in samples proceeding from nitrogen modality and/or from CO30 modality. The intermediate intensities were found in the samples from the CB and CO15 modalities. Since these sensory attributes are positively correlated with the overall quality [5], the samples from CO60 and CO15 modalities were classified as having the highest overall quality, while the samples from CO30 and CN modalities were rated as having the lowest overall quality. The overall quality of the aged wine spirit samples from the barrels presented intermediate values.

Table 3. Sensory attributes intensity (average values) determined by the sensory panel in the wine spirits sampled from different ageing modalities at the end of the ageing experiment (365 days) and the ANOVA summary.



Sensory Attribute	Significance Level	Aged Wine Spirits after 365 Days of Ageing Modality					
		Control	CB	CO15	CO30	CO60	CN
Alcohol	0.048	2.4	1.9 ^a	1.8 ^a	2.3 ^b	2.2 ^{a,b}	2.2 ^{a,b}
Vanilla	0.010	0.0	1.9 ^{a,b}	2.3 ^{b,c}	1.6 ^a	2.5 ^c	1.9 ^{a,b}
Spicy	0.009	0.0	1.6 ^a	2.1 ^b	1.8 ^{a,b}	2.2 ^b	1.6 ^a
Burning	0.041	2.4	2.0 ^a	1.9 ^a	2.5 ^b	2.3 ^{a,b}	2.0 ^a
Body	0.014	2.0	3.0 ^{b,c}	3.1 ^{b,c}	2.8 ^{a,b}	3.2 ^c	2.6 ^a
Unctuous	0.000	1.1	2.7 ^b	2.8 ^b	2.2 ^a	3.1 ^c	2.6 ^b
Flavor evolution	0.000	1.3	3.2 ^b	3.3 ^b	2.6 ^a	3.5 ^b	2.7 ^a
Flavor complexity	0.001	1.8	3.1 ^b	3.2 ^b	2.6 ^a	3.3 ^b	2.7 ^a
Retronasal aroma	0.002	2.4	3.3 ^b	3.3 ^b	2.9 ^a	3.6 ^b	2.9 ^a
Overall quality	0.001	-	14.5 ^{b,c}	14.6 ^c	13.1 ^a	15.1 ^c	13.6 ^{a,b}

For each sensory attribute of aged wine spirit samples, means within the same row followed by different uppercase letters (^a, ^b, ^c) are significantly different ($p < 0.05$).

3.4. Multidimensional Approach of the Similarity/Dissimilarity of Aged Wine Spirit Samples

Based on the previous results, the variables that significantly influenced the variability were used for to a multidimensional analysis through heatmap and PCA to help evaluating the relationship between the sensory and the chemical results, and to assess if the set of variables (sensory and chemical) could be helpful to discriminating the samples from different ageing modalities.

Figure 2 depicts two heatmaps illustrating the multifactorial relationship between volatile compounds or sensory attributes and the different aged wine spirits at 365 days of ageing.

Regarding the volatile compounds, the heatmap clustered three groups of wine spirit modalities: barrel (CB), nitrogen modality (CN) and a group consisting of MOX modalities (CO15, CO30 and CO60). The wine spirit aged in the modalities CO15, CO30 and CO60 have a quite similar volatile composition but with the aforementioned variation showed by the ANOVA results.

This result confirms the influence of the different oxidative media in the aged wine spirit's volatile composition. The cluster of CO15, CO30, and CO60 seems to be related to higher levels of some volatile compounds, such as volatile phenols, acetovanillone, and vanillin.

It was also possible to identify two important subgroups responsible for the observed differences in the studied modalities. The first subgroup comprises the ethyl hexanoate, acetic acid, ethyl acetate, eugenol, vanillin and acetaldehyde and the second one includes guaiacol, syringol, 4-methylguaiacol, 4-methylsyringol, and acetovanillone.

Author Contributions: Conceptualization, I.C.; methodology, I.C., C.V., S.C. (Sara Canas), S.C. (Sofia Catarino), T.A.F., O.A., L.F. and B.B.; software, C.V., I.C., O.A.; validation, I.C.; O.A.; formal analysis, C.V., I.C.; investigation, I.C., S.C. (Sara Canas), O.A.; writing—original draft preparation, I.C., C.V., O.A.; writing—review and editing, I.C.; C.V., O.A., E.G., T.A.F., S.C. (Sara Canas), S.C. (Sofia Catarino); supervision, I.C., O.A.; project administration, S.C. (Sara Canas); funding acquisition, S.C. (Sara Canas), S.C. (Sofia Catarino), I.C., T.A.F., O.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work had the financial support of Portuguese National Funds throughout FCT—Foundation for Science and Technology under the Project POCI-01-0145-FEDER-027819 (PTDC/OCE-ETA/27819/2017). It was also supported by National Funds through FCT—Foundation for Science and Technology under the Projects UIDB/05183/2020 [MED]; UIDB/00239/2020 [CEF]; CEECIND/02725/2018, UIDB/00100/2020, UIDP/00100/2020 [CQE]; UID/AGR/04129/2020, DL 57/2016/CP1382/CT0025 [LEAF].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors are grateful to Victor de Freitas as the Scientific Consultant of the Project POCI-01-0145-FEDER-027819. The authors also thank João Pedro Catela, Manuela Gomes, Eugénia Gomes and Inês Antunes from Adega Cooperativa da Lourinhã, José Abílio Gonçalves and Sérgio Gonçalves from Tanoaria J. M. Gonçalves, Ana Partidário from INIAV—Oeiras, Pedro Rodrigues and Diogo Rodrigues from AZ3Oeno Portugal, Sílvia Lourenço, João Amaral, Deolinda Mota from INIAV—Pólo de Dois Portos, and A. Pedro Belchior for their technical support. The authors are also grateful to the sensory panel.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bertrand, A. Armagnac and Wine-Spirits. In *Fermented Beverage Production*; Lea, A.G.H., Piggot, J., Eds.; Springer US: Boston, MA, USA, 2003; pp. 213–238. [CrossRef]
- Canas, S.; Caldeira, I.; Belchior, A.P.; Spranger, M.I.; Clímaco, M.C.; Bruno-de-Sousa, R. Chestnut Wooden Barrels for the Ageing of Wine Spirits. International Organisation of Vine and Wine. 2018. Available online: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-anddocuments/collective-expertise/spirit-beverages> (accessed on 15 April 2021).
- del Alamo-Sanza, M.; Nevares, I. Oak Wine Barrel as an Active Vessel: A Critical Review of Past and Current Knowledge. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *58*, 2711–2726. [CrossRef]
- Nishimura, K.; Ohnishi, M.; Masuda, M.; Koga, K.; Matsuyama, R. Reactions of Wood Components during Maturation. In *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*; Piggott, J.R., Ed.; Ellis Horwood Limited: West Sussex, UK, 1983; pp. 241–255.
- Caldeira, I.; Mateus, A.M.; Belchior, A.P. Flavour and Odour Profile Modifications during the First Five Years of Lourinhã Brandy Maturation on Different Wooden Barrels. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 264–273. [CrossRef]
- Léauté, R.; Mosedale, J.R.; Mourgues, J.; Puech, J.-L. Barrique et Vieillessement Des Eaux-de-Vie. In *Oenologie Fondements Scientifiques et Technologiques*; Flanzy, C., Ed.; Tec&Doc: Paris, France, 1998; pp. 1085–1142.
- Lurton, L.; Ferrari, G.; Snackers, G. Cognac: Production and Aromatic Characteristics. In *Alcoholic Beverages*; Piggot, J.R., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2012; pp. 242–266. [CrossRef]
- Caldeira, I.; Anjos, O.; Portal, V.; Belchior, A.P.; Canas, S. Sensory and Chemical Modifications of Wine-Brandy Aged with Chestnut and Oak Wood Fragments in Comparison to Wooden Barrels. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *660*, 43–52. [CrossRef] [PubMed]
- Awad, P.; Athès, V.; Decloux, M.E.; Ferrari, G.; Snackers, G.; Raguenaud, P.; Giampaoli, P. Evolution of Volatile Compounds during the Distillation of Cognac Spirit. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7736–7748. [CrossRef] [PubMed]
- Caldeira, I.; Santos, R.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Anjos, O.; Mira, H.; Belchior, A.P.; Canas, S. Kinetics of Odorant Compounds in Wine Brandies Aged in Different Systems. *Food Chem.* **2016**, *211*, 937–946. [CrossRef]
- Caldeira, I.; de Sousa, R.B.; Belchior, A.P.; Clímaco, M.C. A Sensory and Chemical Approach to the Aroma of Wooden Aged Lourinhã Wine Brandy. *Cienc. Tec. Vitiviníc.* **2008**, *23*, 97–110.
- Janáčková, A.; Sádecká, J.; Kohajdová, Z.; Špánik, I. The Identification of Aroma-Active Compounds in Slovak Brandies Using GC-Sniffing, GC-MS and Sensory Evaluation. *Chromatographia* **2008**, *67*, 113–121. [CrossRef]
- Zhao, Y.P.; Wang, L.; Li, J.M.; Pei, G.R.; Liu, Q.S. Comparison of Volatile Compounds in Two Brandies Using HS-SPME Coupled with GC-O, GC-MS and Sensory Evaluation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2011**, *32*, 9–20. [CrossRef]
- Puech, J.-L.; Léauté, R.; Clot, G.; Nomdedeu, L.; Mondié, H. Evolution de Divers Constituants Volatils et Phénoliques Des Eaux-de-Vie de Cognac Au Cours de Leur Vieillessement. *Sci. Aliments* **1984**, *4*, 65–80.

15. Reazin, G.H. Chemical Analysis of Whisky Maturation. In *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*; Piggott, J.R., Ed.; Ellis Horwood Limited: West Sussex, UK, 1983; pp. 225–240.
16. Rodríguez Madrera, R.; García Hevia, A.; Suárez Valles, B. Comparative Study of Two Aging Systems for Cider Brandy Making. Changes in Chemical Composition. *LWT Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 513–520. [[CrossRef](#)]
17. Coldea, T.E.; Socaciu, C.; Mudura, E.; Socaci, S.A.; Ranga, F.; Pop, C.R.; Vriesekoop, F.; Pasqualone, A. Volatile and Phenolic Profiles of Traditional Romanian Apple Brandy after Rapid Ageing with Different Wood Chips. *Food Chem.* **2020**, *320*, 126643. [[CrossRef](#)]
18. Rodríguez-Solana, R.; Rodríguez-Freigedo, S.; Salgado, J.M.; Domínguez, J.M.; Cortés-Diéguez, S. Optimisation of Accelerated Ageing of Grape Marc Distillate on a Micro-Scale Process Using a Box–Behnken Design: Influence of Oak Origin, Fragment Size and Toast Level on the Composition of the Final Product. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2017**, *23*, 5–14. [[CrossRef](#)]
19. Taloumi, T.; Makris, D. Accelerated Aging of the Traditional Greek Distillate Tsipouro Using Wooden Chips. Part I: Effect of Static Maceration vs. Ultrasonication on the Polyphenol Extraction and Antioxidant Activity. *Beverages* **2017**, *3*, 5. [[CrossRef](#)]
20. Quesada Granados, J.; Merelo Guervós, J.J.; Oliveras López, M.J.; González Peñalver, J.; Olalla Herrera, M.; Blanca Herrera, R.; López Martínez, M.C. Application of Artificial Aging Techniques to Samples of Rum and Comparison with Traditionally Aged Rums by Analysis with Artificial Neural Nets. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1470–1477. [[CrossRef](#)]
21. Bortoletto, A.M.; Alcarde, A.R. Aging Marker Profile in Cachaça Is Influenced by Toasted Oak Chips. *J. Inst. Brew.* **2015**, *121*, 70–77. [[CrossRef](#)]
22. Canas, S.; Caldeira, I.; Belchior, A.P. Comparison of Alternative Systems for the Ageing of Wine Brandy. Wood Shape and Wood Botanical Species Effect. *Cienc. Tec. Vitivinic.* **2009**, *24*, 91–99.
23. Cruz, S.; Canas, S.; Belchior, A.P. Effect of Ageing System and Time on the Quality of Wine Brandy Aged at Industrial-Scale. *Cienc. Tec. Vitivinic.* **2012**, *27*, 83–93.
24. Canas, S.; Danalache, F.; Anjos, O.; Fernandes, T.A.; Caldeira, I.; Santos, N.; Fargeton, L.; Boissier, B.; Catarino, S. Behaviour of Low Molecular Weight Compounds, Iron and Copper of Wine Spirit Aged with Chestnut Staves under Different Levels of Micro-Oxygenation. *Molecules* **2020**, *25*, 5266. [[CrossRef](#)]
25. Granja-Soares, J.; Roque, R.; Cabrita, M.J.; Anjos, O.; Belchior, A.P.; Caldeira, I.; Canas, S. Effect of Innovative Technology Using Staves and Micro-Oxygenation on the Odorant and Sensory Profile of Aged Wine Spirit. *Food Chem.* **2020**, *333*, 127450. [[CrossRef](#)]
26. Luis, A.C.P.M.N.; Mota, D.; Anjos, O.; Caldeira, I. Single-Laboratory Validation of Determination of Acetaldehyde, Ethyl Acetate, Methanol and Fusel Alcohols in Wine Spirits, Brandies and Grape Marc Spirits Using GC-FID. *Cienc. Tec. Vitivinic.* **2011**, *26*, 69–76.
27. Caldeira, I.; Pereira, R.; Climaco, M.C.; Belchior, A.P.; Bruno de Sousa, R. Improved Method for Extraction of Aroma Compounds in Aged Brandies and Aqueous Alcoholic Wood Extracts Using Ultrasound. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 125–134. [[CrossRef](#)]
28. ISO 3591:1977. *Sensory Analysis-Wine-Tasting Glass. This Standard Was Last Reviewed and Confirmed in 2016*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2016.
29. Macfie, H.J.M.; Bratchell, N.; Greenhoff, H.; Vallis, L.V. Designs to Balance the Effect of Order of Presentation and First-Order Carry-over Effects in Hall Tests. *J. Sens. Stud.* **1989**, *4*, 129–148. [[CrossRef](#)]
30. Mateo, J.; Jiménez, M. Monoterpenes in Grape Juice and Wines. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 557–567. [[CrossRef](#)]
31. Lurton, L.; Snackers, G.; Roulland, C.; Galy, B.; Versavaud, A. Influence of the Fermentation Yeast Strain on the Composition of Wine Spirits. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 485–491. [[CrossRef](#)]
32. Lillo, M.P.Y.; Agosin, E.; Belancic, A.; Latrille, E. Chemical Markers for Tracking the Sensory Contribution of Production Stages in Muscat Wine Distillates. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, s432–s441. [[CrossRef](#)]
33. Skouroumounis, G.K.; Sefton, M.A. Acid-Catalyzed Hydrolysis of Alcohols and Their β -D-Glucopyranosides. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2033–2039. [[CrossRef](#)]
34. Strauss, C.R.; Wilson, B.; Williams, P.J. Novel Monoterpene Diols and Diol Glycosides in *Vitis Vinifera* Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 569–573. [[CrossRef](#)]
35. Black, C.A.; Parker, M.; Siebert, T.E.; Capone, D.L.; Francis, I.L. Terpenoids and Their Role in Wine Flavour: Recent Advances. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 582–600. [[CrossRef](#)]
36. Slaghenaufi, D.; Ugliano, M. Norisoprenoids, Sesquiterpenes and Terpenoids Content of Valpolicella Wines during Aging: Investigating Aroma Potential in Relationship to Evolution of Tobacco and Balsamic Aroma in Aged Wine. *Front. Chem.* **2018**, *6*. [[CrossRef](#)]
37. Tsakiris, A.; Kallithraka, S.; Kourkoutas, Y. Brandy and Cognac: Manufacture and Chemical Composition. In *Encyclopedia of Food and Health*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 462–468. [[CrossRef](#)]
38. Baron, M.; Prusova, B.; Tomaskova, L.; Kumsta, M.; Sochor, J. Terpene Content of Wine from the Aromatic Grape Variety 'Irsai Oliver' (*Vitis Vinifera* L.) Depends on Maceration Time. *Open Life Sci.* **2017**, *12*, 42–50. [[CrossRef](#)]
39. Fleming, I. *Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions*; John Wiley and Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2009.
40. Fengel, D.; Wegener, G. *Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 2nd ed.; Walter de Gruyter: Berlin, Germany, 1989.
41. Schwarz, M.; Rodríguez, M.C.; Guillén, D.A.; Barroso, C.G. Analytical Characterisation of a Brandy de Jerez during Its Ageing. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *232*, 813–819. [[CrossRef](#)]
42. Valcárcel-Muñoz, M.J.; Guerrero-Chanivet, M.; García-Moreno, M.V.; Rodríguez-Dodero, M.C.; Guillén-Sánchez, D.A. Comparative Evaluation of Brandy de Jerez Aged in American Oak Barrels with Different Times of Use. *Foods* **2021**, *10*, 288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Tsakiris, A.; Kallithraka, S.; Kourkoutas, Y. Grape Brandy Production, Composition and Sensory Evaluation. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 404–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bezhuashvili, M.G.; Eradze, N.N.; Mudjiri, L.A. Formation of Pyrogallol Ether during Oxidative Destruction of Oak Lignine with Air Oxygen. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2000**, *36*, 33–35. [[CrossRef](#)]
45. Viriot, C.; Scalbert, A.; Lapiere, C.; Moutounet, M. Ellagitannins and Lignins in Aging of Spirits in Oak Barrels. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1872–1879. [[CrossRef](#)]
46. Pisarnitskii, A.F.; Askenderov, K.A. Study of Alcohol-Soluble Lignin in Cognac Spirits. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2008**, *44*, 652–656. [[CrossRef](#)]
47. Martínez-Gil, A.; del Alamo-Sanza, M.; Sánchez-Gómez, R.; Nevares, I. Different Woods in Cooperage for Oenology: A Review. *Beverages* **2018**, *4*, 94. [[CrossRef](#)]
48. Peinado, R.A.; Moreno, J.; Bueno, J.E.; Moreno, J.A.; Mauricio, J.C. Comparative Study of Aromatic Compounds in Two Young White Wines Subjected to Pre-Fermentative Cryomaceration. *Food Chem.* **2004**, *84*, 585–590. [[CrossRef](#)]
49. Piornos, J.A.; Delgado, A.; de La Burgade, R.C.J.; Methven, L.; Balagiannis, D.P.; Koussissi, E.; Brouwer, E.; Parker, J.K. Orthonasal and Retronasal Detection Thresholds of 26 Aroma Compounds in a Model Alcohol-Free Beer: Effect of Threshold Calculation Method. *Food Res. Int.* **2019**, *123*, 317–326. [[CrossRef](#)]
50. Culleré, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1653–1660. [[CrossRef](#)]
51. Roussey, C.; Colin, J.; Teissier du Cros, R.; Casalinho, J.; Perré, P. In-Situ Monitoring of Wine Volume, Barrel Mass, Ullage Pressure and Dissolved Oxygen for a Better Understanding of Wine-Barrel-Cellar Interactions. *J. Food Eng.* **2021**, *291*, 110233. [[CrossRef](#)]
52. Canas, S.; Belchior, A.P.; Mateus, A.M.; Spranger, M.L.; Bruno De Sousa, R. Kinetics of Impregnation/Evaporation and Release of Phenolic Compounds from Wood to Brandy in Experimental Model. *Ciência e Técnica Vitivinícola* **2002**, *17*, 1–14.
53. Krebs, G.; Gastl, M.; Becker, T. Chemometric Modeling of Palate Fullness in Lager Beers. *Food Chem.* **2021**, *342*, 128253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gawel, R.; Smith, P.A.; Waters, E.J. Influence of Polysaccharides on the Taste and Mouthfeel of White Wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 350–357. [[CrossRef](#)]