

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CUMARINAS:  
CERTIFICAÇÃO DE UM MÉTODO  
ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO EM AGUARDENTES DE  
CANA ENVELHECIDAS EM BARRIS DE  
DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA**

**LIDIANY MENDONÇA ZACARONI**

**2009**

**LIDIANY MENDONÇA ZACARONI**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CUMARINAS: CERTIFICAÇÃO DE UM  
MÉTODO ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO EM AGUARDENTES DE CANA ENVELHECIDAS  
EM BARRIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Zacaroni, Lidiany Mendonça.

Compostos fenólicos e cumarinas: certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira / Lidiany Mendonça Zacaroni. – Lavras : UFLA, 2009.

138 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Aguardente de cana. 2. HPLC. 3. Compostos fenólicos. 4. Contaminantes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.53

**LIDIANY MENDONÇA ZACARONI**

**COMPOSTOS FENÓLICOS E CUMARINAS: CERTIFICAÇÃO DE UM  
MÉTODO ANALÍTICO PARA CARACTERIZAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO EM AGUARDENTES DE CANA ENVELHECIDAS  
EM BARRIS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MADEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “Stricto Sensu” em Agroquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea	UFS
Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton	UNESP
Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*A Deus*

*Criador de todas as coisas;*

*Ao meu esposo, Deyvid*

*Pelo incentivo, apoio e compreensão;*

*Aos meus pais amados, Silvano e Eliane*

*Por todo carinho, incentivo e compreensão que me deram durante toda a minha vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade. Agradeço por fazerem de mim o que sou agora;*

*As minhas queridas irmãs, Lívia e Lucimara, pelo carinho, incentivo e amizade;*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela dom da vida.

Aos meus queridos pais, Silvano e Eliane, e a todos os meus familiares, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À Profa. Maria das Graças Cardoso, pelos anos de convivência, ensinamentos compartilhados, confiança, incentivo e amizade.

À Profa. Adelir Aparecida Saczk, pelos ensinamentos valiosos compartilhado sobre as análises cromatográficas.

Aos Professores Dr. Haroldo Silveira Dórea (UFS) e a Dra. Márcia Justino Rossini Mutton (UNESP/Jaboticabal), pela participação honrosa na banca avaliadora.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do mestrado e pela utilização dos laboratórios.

Aos professores do DQI/ UFLA, pela amizade e ensinamentos e a todos os funcionários do Departamento de Química.

Aos colegas do curso de Mestrado pela amizade e convivência.

Aos produtores de aguardente de cana, que cederam amostras para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LAFQA/UFLA, Cleuza, Hebe, Masson, Ana Maria, Felipe, Jeancarlo, Wilder e Leonardo, pelo companheirismo, amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Química Orgânica, Luiz Gustavo, Rafaela, Aline, Milene, Roberta, Sara, Paula, Érika, Ana Elisa, Lucilene, Juliana e Geovana pela amizade e colaboração.

À Fapemig e CNPq, pelo suporte financeiro.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 História da aguardente de cana .....	4
2.2 Aguardente de cana / cachaça .....	6
2.3 Processo de produção da aguardente de cana .....	8
2.4 Matéria-prima .....	11
2.5 Fermentação .....	13
2.6 Destilação .....	17
2.7 Componentes secundários.....	20
2.8 Envelhecimento .....	24
2.8.1 Madeira.....	27
2.8.2 Compostos presentes em aguardentes de cana envelhecidas .....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.1 Obtenção das amostras.....	50
3.2 Análises físico-químicas .....	51
3.2.1 Exame organoléptico .....	51
3.2.2 Teor alcoólico .....	51
3.2.3 Extrato seco .....	51
3.2.4 Acidez volátil.....	52
3.2.5 Álcoois superiores.....	52

3.2.6 Aldeídos.....	52
3.2.7 Furfural.....	53
3.2.8 Ésteres.....	53
3.2.8 Metanol.....	53
3.2.10 Cobre.....	53
3.3 Contaminantes.....	54
3.3.1 Carbamato de etila.....	54
3.3.2 Acroleína.....	55
3.3.2.1 Preparo da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína.....	55
3.3.2.2 Derivação da amostra.....	56
3.3.3.3 Aparatos HPLC.....	56
3.3.3.4 Análise quantitativa.....	57
3.4 Compostos fenólicos.....	58
3.4.1 Reagentes e padrões.....	58
3.4.2 Preparação das amostras e padrões.....	58
3.4.3 Condições HPLC.....	58
3.5 Análise de cumarinas.....	60
3.4.4 Extração em fase sólida.....	60
3.6 Delineamento experimental.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Análises físico-químicas.....	61
4.2 Contaminantes.....	66
4.2.1 Carbamato de etila.....	66
4.2.2 Acroleína.....	69
4.3 Análise dos compostos fenólicos.....	73
4.3.1 Otimização do método analítico.....	73
4.3.2 Certificação do método analítico.....	78



4.3.3 Quantificação dos compostos fenólicos em aguardentes de cana por Cromatografia líquida de alta eficiência .....	91
4.3.4 Análise de cumarinas .....	97
5 CONCLUSÕES .....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
ANEXOS .....	115

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
FIGURA 1	Etapas do processo de produção de aguardente de cana.....	9
FIGURA 2	Aspectos macroscópicos da madeira em uma seção transversal do tronco.....	28
FIGURA 3	Reações de oxidação dos compostos fenólicos.....	30
FIGURA 4	Principais compostos fenólicos incorporados à aguardente de cana.....	37
FIGURA 5	Estrutura química dos ácidos benzóicos.....	38
FIGURA 6	Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.....	38
FIGURA 7	Formação de taninos hidrolisáveis.....	40
FIGURA 8	Monômero básico para a formação dos taninos condensados (flavan-3-ol).....	40
FIGURA 9	Estrutura química da lignina.....	42
FIGURA 10	Precusores primários da lignina.....	43
FIGURA 11	Biossíntese das cumarinas (Simões et al., 2004).....	44
FIGURA 12	Estruturas químicas propostas para os principais compostos detectados em cachaça envelhecida em tonéis de diferentes madeiras.....	49
FIGURA 13	Reação de formação da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína.....	56
FIGURA 14	Histograma dos teores de cobre e carbamato de etila (CE) nas amostras de aguardentes de cana.....	68
FIGURA 15	Cromatograma do padrão da 2,4-DNPH de acroleína.....	70
FIGURA 16	Cromatograma da amostra de aguardente de cana. Pico identificado: A = acroleína.....	70

FIGURA 17	Via metabólica de obtenção da acroleína. Adaptado de Azevêdo et al. (2007).....	72
FIGURA 18	Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido vanílico, (4) fenol, (5) ácido siríngico, (6) vanilina, (7) siringaldeído, (8) umbeliferona, (9) ácido p-cumárico, (10) ácido sinápico, (11) ácido m-cumárico, (12) cumarina, (13) 4-metilumbeliferona, (14) ácido o-cumárico, (15) ácido elágico, (16) eugenol.....	74
FIGURA 19	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido gálico. Equação da reta: $y = - 8372,32 + 4,39 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9993.....	79
FIGURA 20	Curva analítica obtida a partir das soluções de catequina. Equação da reta: $y = - 490,18 + 1,06 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.....	79
FIGURA 21	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido vanílico. Equação da reta: $y = 293,40 + 2,75 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9990.....	80
FIGURA 22	Curva analítica obtida a partir das soluções de fenol. Equação da reta: $y = - 486,48 + 7,01 \times 10^3 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9991.....	80
FIGURA 23	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido siríngico. Equação da reta : $y = 510,34 + 4,57 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.....	81
FIGURA 24	Curva analítica obtida a partir das soluções de vanilina. Equação da reta: $y = 996,25 + 6,29 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9992.....	81

FIGURA 25	Curva analítica obtida a partir das soluções de siringaldeído. Equação da reta: $y = 184,04 + 3,23 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9992.....	82
FIGURA 26	Curva analítica obtida a partir das soluções de umbeliferona. Equação da reta: $y = 2074,88 + 1,04 \times 10^5 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9996.....	82
FIGURA 27	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido p-cumárico. Equação da reta: $y = -2797,20 + 2,52 \times 10^3 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9989.....	83
FIGURA 28	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido sinápico. Equação da reta: $y = 12449,81 + 2,18 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.....	83
FIGURA 29	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido m-cumárico. Equação da reta: $y = 8512,04 + 1,04 \times 10^5 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.....	84
FIGURA 30	Curva analítica obtida a partir das soluções de cumarina. Equação da reta: $y = -5465,37 + 7,88 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9998.....	84
FIGURA 31	Curva analítica obtida a partir das soluções de 4-metilumbeliferona. Equação da reta: $y = -1685,99 + 2,73 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9995.....	85
FIGURA 32	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido o-cumárico. Equação da reta: $y = -847,83 + 8,78 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9994.....	85
FIGURA 33	Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido elágico. Equação da reta: $y = -7796,20 + 2,14 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9983.....	86
FIGURA 34	Curva analítica obtida a partir das soluções de eugenol.	

	Equação da reta: $y = 738,40 + 1,59 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9987.....	86
FIGURA 35	Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de carvalho.....	92
FIGURA 36	Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de jequitibá.....	93
FIGURA 37	Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de bálsamo.....	93
FIGURA 38	Reação de preparação da fase estacionária de fase reversa, onde $R = C_{18}, C_8, C_2$ , etc.....	98
FIGURA 39	Estrutura química da (1) cumarina, (2) umbeliferona e (3) 4-metilumbeliferona.....	100

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
TABELA 1	Padrões de identidade da aguardente de cana e da cachaça (Brasil, 2005).....	10
TABELA 2	Locais de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).....	50
TABELA 3	Condições do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) para análise de acroleína.....	57
TABELA 4	Condições Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) para análise dos compostos fenólicos.....	59
TABELA 5	Análises físico-químicas das aguardentes de cana envelhecidas.....	65
TABELA 6	Concentração de carbamato de etila nas amostras de aguardente de cana.....	66
TABELA 7	Concentração (mg/100 mL de álcool anidro) de acroleína nas amostras de aguardente de cana analisadas.....	71
TABELA 8	Tempos de retenção ( $t_r$ ) e valores dos fatores de retenção ( $k'$ ) e separação ( $\alpha$ ) e da resolução (R) para o método empregado.....	75
TABELA 9	Parâmetros cromatográficos (fator de retenção - $k'$ , fator de separação - $\alpha$ e resolução - R) obtidos quando se variou o solvente de eluição (ACNP1) e as temperaturas (30°C - M30P1 e 35°C - M35P1).....	77
TABELA 10	Linearidade, sensibilidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos compostos.....	87
TABELA 11	Médias das áreas dos picos para os compostos fenólicos	

	obtidos de injeções consecutivas de três diferentes concentrações e os respectivos desvio padrão relativo (% RSD).....	89
TABELA 12	Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de aguardente de cana.....	90
TABELA 13	Concentração (mg/L) de compostos fenólicos nas amostras de aguardente de cana analisadas.....	94
TABELA 14	Análise de cumarinas em aguardentes de cana envelhecidas em amostras sem tratamento prévio e em amostras tratadas por SPE.....	99

## LISTA DE SIGLAS

Apex - Agência de Promoção de Exportações.

FDA – Food And Drug Administration.

GC-MS – Gas Chromatography Mass Spectrometry

°GL – Grau Gay-Lussac (% v/v).

Gy - Gray

HPLC – High Performance Liquid Chromatographic

Iarc – International Agency for Research on Câncer.

Ibrac - Instituto Brasileiro da Cachaça

LAFQA – Laboratório de Análises Físico-Qímicas de Aguardente de cana.

Mapa – Ministério da Agrigultura, Pecuária e Abastecimento.

PIQ's - Padrões de Identidade e Qualidade.

RSD – Relative Standard Deviations

SPE – Solid Phase Extraction.

WHO – World Health Organization.



## RESUMO

Zacaroni, Lidiany Mendonça. **Compostos fenólicos e cumarinas:** certificação de um método analítico para caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. 2009. 138p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A aguardente de cana é uma bebida fermento-destilada largamente consumida no país. Estima-se que sua produção seja de aproximadamente 1,5 bilhão de litros/ano, sendo o volume exportado representado por apenas 1% da produção. Diante desse cenário, tem-se buscado cada vez mais formas alternativas para se agregar valor ao produto, sendo que o envelhecimento tem-se tornado uma prática comum entre os produtores da bebida. Embora as madeiras de carvalho ainda predominem nesse processo, a utilização de madeiras nativas tem recebido destaque nos últimos anos, exigindo que se estabeleçam estudos para a caracterização química das bebidas provenientes dessas. Com base no exposto, no presente trabalho objetivou-se certificar um método analítico para caracterizar e quantificar os compostos fenólicos e cumarinas em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira, bem como avaliá-las físico-quimicamente. Foram analisadas doze amostras de aguardente de cana envelhecidas em barris de carvalho, amburana, jequitibá, castanheira, louro-canela, bálsamo e jatobá, provenientes da região sul de Minas Gerais. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise Físico-Química de Aguardente (LAFQA/DQI) da Universidade Federal de Lavras. Também avaliou-se a presença dos contaminantes carbamato de etila e acroleína nas amostras. A análise dos compostos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos na Universidade Federal de Lavras. Também empregou-se a extração em fase sólida (SPE) para a determinação de cumarinas. Os valores obtidos para os compostos fenólicos variaram de 0,08 a 18,38 mg/L, observando a predominância de diferentes compostos nas diferentes espécies de madeira utilizadas. Após aplicação da técnica de SPE, pôde-se observar um aumento da detecção de cumarina e diminuição na detecção para umbeliferona e 4-metilumbeliferona.

---

\* Comitê Orientador: Profa. Maria das Graças Cardoso – UFLA – Orientadora e Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk – UFLA – Co-orientadora

## ABSTRACT

Zacaroni, Lidiany Mendonça. **Phenolic and coumarin compounds:** certification of an analytical method for the characterization and quantification in cane spirits aged in barrels of different wood species. 2009. 138p. Dissertation (Master's in Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Sugar cane liquor is a fermented-distilled drink widely consumed in the country. It is considered that its production is approximately 1.5 billion liters/ano, and the exported volume represents only 1% of the production. In view of this, there has been an increasing search for alternative ways to aggregate value to the product; aging becoming a common practice among producers. Although oak wood still prevails in that process, the use of native wood has been receiving prominence in recent years, demanding that studies are established for the chemical characterization of the drinks originating from such woods. Based on the above, the present work aimed to certify an analytical method to characterize and to quantify the phenolic and coumarin compounds in cane liquors aged in barrels of different wood species, as well as to evaluate them physical-chemically. Twelve samples of cane liquor were analyzed, aged in oak, amburana, jequitibá, Brazil-nut, louro-cinnamon, balsam and jatoba barrels, coming of the south area of Minas Gerais. The physicochemical analyses were carried out at the Laboratório de Análise Físico-Química de Aguardente (LAFQA/DQI) of the Universidade Federal de Lavras. The presence of the pollutants ethyl carbamate and acrolein were also evaluated in the samples. The analysis of the phenolic compounds was done by high efficiency liquid chromatography with a diode array detector at the Universidade Federal de Lavras. Also the extraction was used in solid phase (SPE) for the coumarin determination. The values obtained for the phenolic compounds varied from 0,08 to 18.38 mg L<sup>-1</sup>, observing the predominance of different compounds from the different wood species used. After the SPE technique application, a coumarin detection increase and a decrease in the detection of umbelliferone and 4-methylumbelliferone can be observed.

---

\* Orientation committee: Profa. Maria das Graças Cardoso – UFLA – Advisor e Profa. Dra. Adeli Aparecida Saczk – UFLA – Co-advisor

## 1 INTRODUÇÃO

As aguardentes são bebidas alcoólicas fermento-destiladas provenientes de várias matérias-primas. Em nosso país, predomina a aguardente de cana-de-açúcar, que constitui uma bebida alcoólica destilada de origem genuinamente brasileira.

A história da aguardente de cana data desde o período colonial, durante o qual era produzida nas fazendas em pequenos engenhos. No início era reservada apenas aos escravos, ganhando depois grande importância na economia do Brasil-colônia. Atualmente, as destilarias acham-se distribuídas em qualquer parte do país, com produção variável da bebida (Furtado, 1995).

O consumo da aguardente de cana é hábito de todas as classes sociais, sendo mais difundido entre a população de menor poder aquisitivo. A aguardente de cana artesanal tem grande procura na zona rural, e foi largamente consumida pela classe de menor condição sócio-econômica. No entanto, essa situação tem sido revertida e a bebida tem conquistado as mesas e adegas de grandes restaurantes e da população de maior poder aquisitivo. A aguardente de cana brasileira tem recebido embalagens novas e sofisticadas, observando-se uma crescente preocupação em se produzir um produto de qualidade.

O agronegócio da aguardente de cana é um dos investimentos que mais crescem no país. Estima-se que a produção anual da bebida seja de 1,5 bilhão de litros, tendo um total de 30 mil estabelecimentos produtores, gerando mais de 450 mil empregos diretos e indiretos (Apex Brasil, 2008). Isso a coloca como a segunda bebida mais consumida no país e a terceira mais consumida no mundo. A caipirinha, um drinque produzido pela aguardente de cana e limão, também tem merecido destaque no *ranking* internacional, conquistando a posição entre os oito drinques mais consumidos. Segundo dados divulgados pelo Ibrac -

Instituto Brasileiro da Cachaça, a exportação nos cinco primeiros meses do ano de 2008 aumentou em 46% seu volume e 37% em valor, comparado com o mesmo período do ano passado. Os números representam uma receita de US\$ 6,9 milhões e um total de 4,6 milhões de litros exportados até maio deste ano (Cana Brasil, 2008). A bebida é exportada para 70 países, sendo a Alemanha o maior mercado consumidor. No entanto, esse valor exportado ainda é muito pequeno, correspondendo apenas 1% da produção.

No cenário nacional, a bebida é produzida praticamente em todos os estados brasileiros. São Paulo é o maior produtor nacional, detendo 44% da produção e também o mais especializado na produção da aguardente industrial. Minas Gerais destaca-se na terceira posição contribuindo com 8% e liderando a produção da aguardente artesanal. Estima-se que no Estado haja mais de 8500 alambiques, porém, mais de 90% trabalham na clandestinidade (Cardoso, 2006).

Diante do mercado cada vez mais competitivo da bebida, o seu armazenamento em barris de madeira tem se tornado uma prática comum entre os produtores. O envelhecimento é uma etapa do processo de produção da aguardente de cana, que pode ou não ser inserido durante a produção. Essa prática tem se tornado uma grande fonte para agregar valor ao produto, pois incorpora à bebida diversos compostos oriundos da madeira, melhorando sensorialmente sua qualidade. O armazenamento em barris de madeira também promove a diminuição do teor alcoólico, assim como o aumento do teor de açúcares.

A madeira mais utilizada no envelhecimento é o carvalho, pois ela contempla o maior número de propriedades desejáveis ao processo, tais como cor, cheiro, durabilidade natural, permeabilidade, trabalhabilidade, densidade e resistência mecânica. No entanto, sua aquisição é difícil, pois normalmente os produtores reutilizam barris anteriormente empregados para o envelhecimento de outras bebidas alcoólicas, além de não se encontrar no mercado barris de

distintas capacidades. Por isso, tem-se observado uma crescente busca por madeiras nativas. No entanto, estudos sobre caracterização química de aguardentes de cana envelhecidas em diferentes barris de madeira ainda são muito escassos. Sabe-se que alguns compostos são tóxicos, sendo, portanto, indesejáveis à bebida. Dessa forma, observa-se uma enorme carência de informações técnicas sobre as características, vantagens e desvantagens de cada tipo de madeira, dificultando a produção de bebidas com aroma e paladar peculiares. Com base no exposto, com o presente trabalho objetivou-se certificar um método analítico para caracterizar e quantificar os compostos fenólicos e cumarinas em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira, bem como avaliá-las físico-quimicamente.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 História da aguardente de cana

A aguardente de cana é uma bebida fermento-destilada cuja origem vem desde o tempo da escravidão.

Os primeiros relatos sobre a técnica de fermentação vêm dos egípcios antigos, que curavam várias doenças, inalando vapores de líquidos aromatizados e fermentados. Em seguida, os gregos relataram sobre o processo de obtenção da *ácqua ardens* ou aguardente, a qual foi atribuída propriedades místico-medicinais, transformando-se em água da vida (*eau de Vie*). A aguardente foi para a Europa e para o Oriente Médio, pela força da expansão do Império Romano. Foram os árabes que descobriram os equipamentos para a destilação, semelhantes aos que conhecemos hoje. A tecnologia de produção espalhou-se pelo velho e novo mundo. Na Itália, o destilado de uva ficou conhecido como Grappa. Em terras germânicas, destilou-se, a partir da cereja, o kirsch. Na Escócia ficou popular o uísque, destilado da cevada sacarificada. Na Rússia a vodka foi produzida do centeio. Na China e Japão, o saquê foi feito do arroz; Portugal também absorveu a tecnologia dos árabes e destilou a partir do bagaço de uva, a bagaceira (Queiroz, 2008).

No Brasil, a produção de aguardente de cana confunde-se com a própria história do país. Em 1532, os portugueses introduziram a cana-de-açúcar no país e no ano seguinte instalou-se o primeiro engenho de açúcar. Inicialmente a cana era utilizada apenas para a produção do açúcar. Nos engenhos, os escravos perceberam que o caldo da cana deixado nos tachos de melaço, “a garapa azeda”, fermentava e resultava em uma bebida alcoólica. No início, a bebida era reservada apenas aos escravos. No entanto, com o aprimoramento das técnicas de produção, passou a fazer parte também das mesas dos senhores de engenho.

Nos meados do século XVI até metade do século XVII, as “casas de cozer méis” multiplicaram-se nos engenhos e a bebida tornou-se moeda corrente para a compra de escravos na África. No ano de 1756, a aguardente de cana foi um dos gêneros que mais contribuiu com impostos para a reconstrução de Lisboa, que havia sido abatida por um imenso terremoto (Cardoso, 2006).

Em meados do século XVIII, como símbolo dos Ideais de Liberdade, a aguardente de cana percorreu as mesas dos inconfidentes e da população que apoiava a Conjuração Mineira, transformando-se no símbolo de resistência à dominação portuguesa. A bebida passou, ainda, acrescida de gengibre e outros ingredientes e sobre o nome de quentão, a substituir a bagaceira nas festas religiosas, como a de São João (Queiroz, 2008).

No século XIX e início do século XX, a elite e a classe média, buscando demonstrar sua identificação com a cultura europeia, desenvolveram um forte preconceito contra os hábitos e costumes brasileiros. A aguardente de cana passou a ser considerada uma bebida de baixa qualidade, destinada ao consumo dos menos favorecidos, tanto financeiramente quanto intelectualmente. Contudo, esse panorama começou a se alterar com a Semana da Arte, em 1922, em que ocorreu um resgate da brasilidade, ou seja, da valorização da cultura brasileira (Sebrae, 2001).

Com o passar dos tempos, melhoraram-se as técnicas de produção. Hoje, várias marcas de alta qualidade figuram no comércio nacional e internacional, estando presente nos melhores restaurantes e adegas residenciais pelo Brasil e pelo mundo. A aguardente de cana deixou de ser bebida de pobre e passou a ter lugar de destaque nos brindes nacionais, nas festas de requinte e entre os estrangeiros. Ganhou nome próprio no exterior “Cachaça do Brasil” e a ela são voltados vários planos e projetos do governo para a sua expansão em âmbito nacional e internacional.

## **2.2 Aguardente de cana/cachaça**

De acordo com o Decreto nº 4851 de 2003 (Brasil, 2003) e com a Instrução Normativa nº 13, de 30 de junho de 2005 (Brasil, 2005), aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressas em sacarose. A cachaça, entretanto, foi definida como sendo a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48% v/v à 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose (Brasil, 2005).

A aguardente de cana é a segunda bebida mais consumida no país, ficando atrás apenas da cerveja. A produção anual da bebida é de 1,5 bilhão de litros. São Paulo é o maior produtor da aguardente de cana industrial e Minas Gerais, o mais especializado na produção de aguardente de cana artesanal (Cardoso, 2006).

A aguardente de cana artesanal difere-se da industrial pelo processo de produção. A produção da primeira é feita em batelada e geralmente em alambiques de cobre. Segundo Faria et al. (2003), esse metal tem grande efeito sobre a qualidade sensorial da bebida, pois acredita-se que este catalise reações importantes na formação e eliminação de compostos relacionados ao flavour da bebida. A aguardente de cana industrial é produzida em série e em destiladores de aço inox, o qual pode transferir compostos indesejáveis, como os compostos sulfurados, para a bebida.

Em Minas Gerais, o agronegócio da aguardente de cana tem significativa importância econômica e social. Atualmente, o estado possui cerca de 8.466 alambiques, com uma estimativa de produção que alcança 200 milhões



de litros por ano, movimentando R\$ 1,5 bilhão só com o mercado interno, gerando cerca de 240 mil empregos. Desse total produzido, apenas 0,3% é exportado. Minas é responsável por aproximadamente 8% do total da produção nacional da bebida. Embora a atividade da produção de aguardente de cana seja economicamente importante, estima-se que aproximadamente 90% da produção artesanal no Estado de Minas Gerais sejam produzidos em alambiques clandestinos (Sebrae, 2001; Cardoso, 2006).

A aguardente de cana, largamente consumida no Brasil, é uma bebida produzida em todas as regiões do país e é encontrada em mais de 960 mil pontos de vendas, entre bares, supermercados e restaurantes, gerando cerca de 400 mil empregos diretos. Atualmente há no país mais de 30 mil produtores da bebida e mais de 5 mil marcas sendo comercializadas (Sebrae, 2001).

Segundo Campelo (2002), no *ranking* mundial de consumo de destilados, a aguardente de cana foi elevada ao posto de bebida nobre, ocupando a terceira posição, ficando atrás apenas da vodca e do soju (bebida asiática à base de sorgo). No cenário internacional, as exportações, que em 1983 alcançaram 2,1 milhões de litros, cresceram para 5,9 milhões em 1993, gerando um montante de US\$8,4 milhões. Em 2001, as exportações, principalmente para a Europa, chegaram a US\$ 8,5 milhões (11 milhões de litros). A meta para 2010 é exportar US\$100 milhões. Segundo esse, os maiores importadores da aguardente de cana brasileira na Europa são a Alemanha (8,8%), seguida de Portugal. Os Estados Unidos representam 2,7% das exportações brasileiras. Na América Latina, os países consumidores são Paraguai, Uruguai e Equador. Outros países promissores ao consumo da bebida são Japão e Itália.

O Brasil é considerado como um dos maiores mercados mundiais de bebidas, onde a média anual de consumo da aguardente de cana é de 11L/habitante. Acompanhando essa tendência mundial de crescimento do consumo, têm-se verificado muitas mudanças no ambiente institucional no que

se refere à atividade produtora de aguardente de cana, tanto no âmbito nacional quanto estadual. Tais ações voltaram-se no sentido de tornar a atividade mais eficiente e articulada. Em 1997, foi criado o Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana (PBDAC), que, além de reunir, atualmente, cerca de 75% da produção nacional, desenvolve esforços no sentido de conscientizar produtores quanto à importância de uma ação para valorizar o produto e ampliar os mercados internos e externos. Destaca-se também o reconhecimento da aguardente de cana no governo de Fernando Henrique Cardoso, como bebida típica brasileira e a inserção de um projeto na Agência de Promoção de Exportações (Apex), cujo objetivo é aumentar o nível das exportações, através da qualidade oferecida e de uma política de marketing (Estanislau et al., 2002).

### **2.3 Processo de produção da aguardente de cana**

Diante do aumento do consumo da aguardente de cana no Brasil e do crescente avanço no mercado externo, tornam-se imprescindíveis o controle de qualidade e a padronização frente às etapas de produção da bebida.

As bebidas alcoólicas fermento-destiladas distinguem-se uma das outras pela presença de componentes secundários que irão formar um “buquê” característico de cada bebida. Esses componentes secundários formam-se juntamente com o álcool etílico durante o processo de fermentação do mosto, mudam de caráter e proporção durante a destilação, havendo uma posterior maturação do produto (Almeida & Barreto, 1971).

As etapas que devem ser observadas para a produção de uma aguardente de cana com qualidade estão apresentadas na Figura 1, e vão desde o plantio da cana até a comercialização do produto.

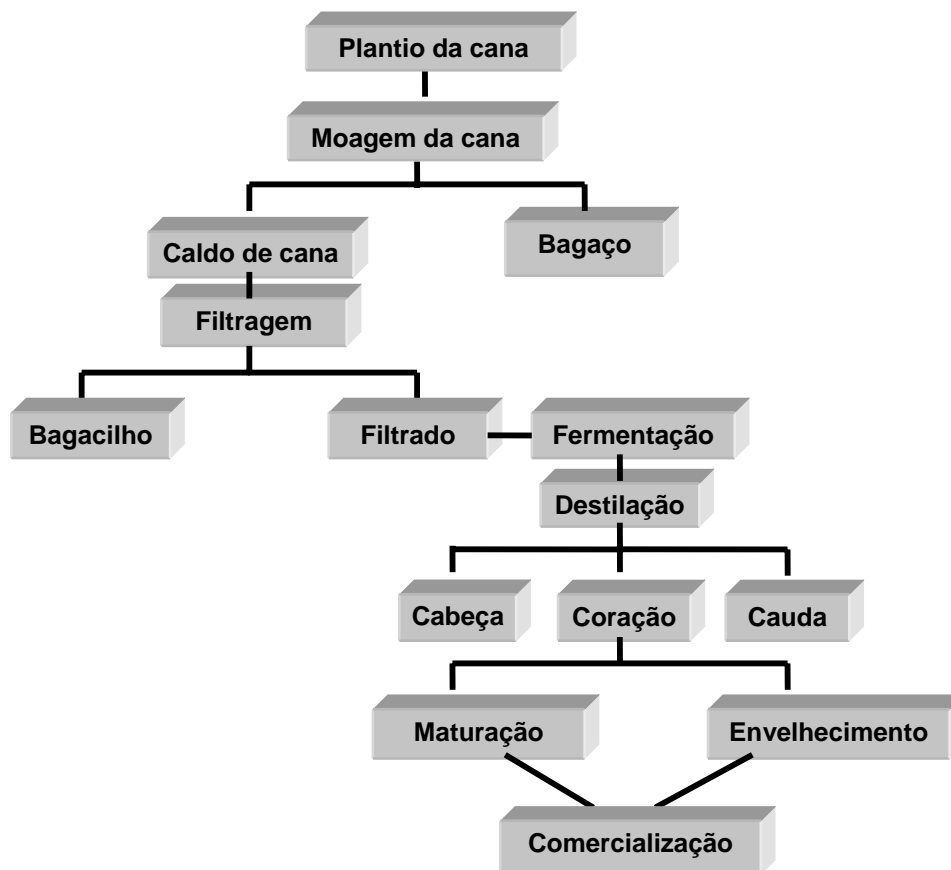


FIGURA 1 - Etapas do processo de produção de aguardente de cana.

Uma bebida de qualidade deve atender aos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) exigidos pela Legislação Brasileira, bem como aos requisitos sensoriais, que envolvem cor, sabor e aroma. De acordo com a Instrução Normativa nº 13, de 30 de junho de 2005 (Brasil, 2005), os PIQ's para aguardente de cana, estabelecidos pela Legislação Brasileira, foram definidos como descritos na Tabela 1:

TABELA 1 – Padrões de identidade da aguardente de cana e da cachaça (Brasil, 2005).

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica de aguardente	% em volume de álcool etílico	38	54
Graduação alcoólica de cachaça	% em volume de álcool etílico a 20°C	38	48
Sacarose em açúcar cristal, refinado, invertido ou glicose***	g/L	6,0	30
Acidez volátil em ácido acético	mg/100 mL álcool anidro	-	150
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL álcool anidro	-	200
Aldeídos, em aldeído acético	mg/100 mL álcool anidro	-	30
Furfural	mg/100 mL álcool anidro	-	5,0
Álcoois superiores*	mg/100 mL álcool anidro	-	360
Congêneres**	mg/100 mL álcool anidro	200	650
Álcool metílico	mg/100 mL álcool anidro	-	20
Cobre	mg/L	-	5,0
Extrato seco	g/L	-	6,0***
Carbamato de etila	µg/L	-	150
Partículas em suspensão (resíduo sólido)	-	Ausente	Ausente

\*Álcoois superiores = (isobutílico + isoamílico + propílico)

\*\*Congêneres = (Acidez Volátil + Ésteres + Aldeídos + Furfural + Álcoois Superiores).

\*\*\*Aguardente de cana e cachaça “adoçada” = máximo 30,0 g/L

Foram também definidas outras quantidades máximas de contaminantes, como: acroleína (5 mg/100 mL de álcool anidro), álcool sec-butílico (10 mg/100

mL de álcool anidro), álcool butílico (3 mg/100 mL de álcool anidro), chumbo (200 µg/L) e arsênio (100 µg/L).

Esses requisitos de qualidade estão sendo cada vez mais procurados, principalmente devido à demanda dos mercados externos e internos, cada vez mais exigentes, do esclarecimento dos consumidores e da disponibilidade de novos métodos analíticos (Barcelos, 2007).

#### **2.4 Matéria-prima**

A cana-de-açúcar é uma gramínea da classe das monocotiledôneas, cujo nome atualmente é *Saccharum* spp., pois todas as variedades de cana cultivadas no mundo são híbridas, envolvendo uma ou mais espécies diferentes. Atualmente, a cana-de-açúcar apresenta importância econômica na produção de álcool, açúcar, cachaça, forragem e outros produtos (Andrade, 2006). Segundo Mendonça (2008), essa é a segunda cultura em termos de valor de exportação, atingindo 12% das exportações agropecuárias nacionais.

O volume de cana processada até o final da segunda metade de novembro de 2008 foi de 468,63 milhões de toneladas, representando crescimento de 12,31% em relação ao acumulado no mesmo período da safra anterior, de acordo com os dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) (Cana Brasil, 2008). Esses dados ratificam o Brasil como maior produtor mundial de cana-de-açúcar.

Novaes (1995) mostrou que não há variedades de cana que sejam específicas para a produção de aguardente de cana, pois as pequenas diferenças na sua composição físico-química muito provavelmente não teriam qualquer influência na qualidade da bebida final. As variedades de cana devem ser adaptadas às condições edafoclimáticas da região onde se encontra instalada a unidade industrial, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área. A matéria-prima destinada à produção de aguardente de cana

com boas características sensoriais deve ser de excelente qualidade, estar no ponto de maturação, apresentar boas condições fitossanitárias, sem deterioração, não passar pela queima no campo e, se possível, não ter contato com o solo após o corte (Novaes, 1997).

De acordo com Maia & Nelson (1994), as diferenças existentes de uma variedade de cana-de-açúcar para outra não é um fator limitante da qualidade, pois desde que a cana forneça o teor necessário de açúcar, todos os demais requisitos nutricionais das leveduras, no momento da fermentação, poderão ser suplementados pelo fabricante.

Para Andrade (2006), na produção de aguardente, a matéria-prima que interessa são os colmos de cana-de-açúcar. Segundo ele, basicamente, os colmos devem apresentar as seguintes características:

- maduros: quando a cana encontra-se madura, o terço superior da cana, apresenta folhas de coloração verde-amarelada e menos eretas, enquanto as folhas que se localizam nos terços basal e médio encontram-se totalmente secas, chegando, em alguns casos, a desprenderem-se dos colmos. Quando a cana floresce, é também sinal de que ela já está madura, a demora da colheita representará perdas no rendimento da produção de aguardente de cana;
- recém-cortados: os colmos a serem moídos devem ser recém-cortados ou frescos. Recomenda-se que o intervalo entre corte de cana e moagem não ultrapasse 48 horas;
- limpos: a presença de impurezas (matéria estranha de origem vegetal, ponteiros de cana ou restos de folhas e matéria estranha mineral - terra, pedra, etc.) faz com que o rendimento seja menor, além de levar a possíveis contaminações do caldo de cana por bactérias;
- sadios: a incidência muito alta de podridão-vermelha promove uma redução nos teores de açúcar da cana e, como conseqüência, o rendimento em aguardente

também é reduzido, implicando que o estado sanitário do colmo também é extremamente importante.

Geralmente, as variedades de cana que são adequadas para a produção de açúcar e álcool, são boas também para a produção de aguardente de cana. As mudas de cana-de-açúcar, preferencialmente, devem ser adquiridas de viveiros de usinas e destilarias, instituições de pesquisa ou ensino na área de Ciências Agrárias, a fim de se plantar um material sadio, de alto vigor e pureza varietal. Na impossibilidade, devem-se retirar mudas dos canaviais de primeiro corte, bem desenvolvidas e sadias (Andrade, 2006).

## **2.5 Fermentação**

A fermentação alcoólica consiste na transformação de açúcares do mosto em etanol e CO<sub>2</sub>. Entretanto, dependendo de como essa transformação é realizada, pode-se obter um produto de melhor ou pior qualidade. Além desses produtos formados pelas leveduras, também são produzidas outras substâncias, como o glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores (isobutílico, isoamílico e propílico), acetaldeído, acetoína ou hidróxi-butanona, que, quando formados, diminuem o rendimento do etanol (Schwan & Castro, 2001). Geralmente, o processo dura 24 horas; porém, quando se destila o caldo de cana com fermentação incompleta, podem ocorrer incrustações no alambique e formação de furfural, resultando em aromas e sabores indesejáveis na cachaça (Gomes, 2002).

A população responsável pela fermentação do caldo de cana-de-açúcar é constituída normalmente por leveduras e bactérias. As leveduras envolvidas na fermentação do caldo de cana incluem, principalmente, os gêneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e diversas espécies de *Cândida* (Schwan & Castro, 2001; Pataro et al., 2002; Guerra et al., 2002). Dentre essas, a *Saccharomyces cerevisiae* é

predominante e a principal responsável pela fermentação, pois essa levedura suporta níveis elevados de etanol (12 a 15%), hidrolisa oligossacarídeos, tais como a maltotriose e maltotetraose em glicose para a produção e transformação em etanol, e tolera alta concentração de açúcar (Pataro et al., 2002)

As populações bacterianas encontradas são, na maioria, Gram-positivas. Entre essas, as bactérias produtoras de ácido láctico merecem destaque, pois podem produzir compostos secundários, principalmente ácidos, elevando-se, assim, os níveis de acidez da bebida. Essas bactérias multiplicam-se no final do processo fermentativo, utilizando o etanol formado como fonte de energia. Portanto, não é aconselhável que a destilação ocorra horas depois que todo o açúcar tenha sido consumido pelas leveduras.

Pataro et al. (2002) mostraram que as populações de bactérias Gram-negativas ocorrem em menor número e somente após 16 horas do início do processo fermentativo. As principais espécies identificadas foram: *Acetobacter acetii* (produtora de ácido acético), e espécies de *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Serratia*. Os pesquisadores citam que a contaminação bacteriana é uma das principais causas da redução na produção de etanol durante fermentações desenvolvidas por *S. cerevisiae*. Posteriormente, Sousa (2005) mostrou que essas bactérias podem levar os açúcares para outra via metabólica, resultando na formação de diversos compostos, como os ácidos láctico, acético, fórmico e butírico, aldeídos e ésteres. Isso leva à redução do teor alcoólico e depreciação da qualidade sensorial do produto. Deve-se evitar, também, a fermentação do caldo de cana na presença de suco ou polpas de frutas ricas em pectinas, pois isso promove o aumento da concentração de metanol (Cardoso, 2006).

Antes de iniciar a fermentação, o caldo de cana bruto deve sofrer um tratamento térmico (aproximadamente 105°C), visando a reduzir microrganismos contaminantes. Em seguida, é decantado e resfriado a 30°C (Schwan, 2006). Pesquisadores ressaltam que o processo de fermentação para



aguardente de cana é realizado em duas etapas distintas. A primeira é a propagação do microrganismo, que é feita sob intensa aeração e em mostos diluídos com teores de açúcar próximos a 5°Brix; e a segunda etapa é a fermentação propriamente dita, na qual o caldo adicionado deve apresentar teores de açúcar entre 14 e 16°Brix. Essa fermentação consiste de três fases:

- fermentação inicial ou pré-fermentação, em que o mosto apresenta quantidade de O<sub>2</sub> necessário para a multiplicação de leveduras;

- fermentação principal ou tumultuosa, que se inicia quando não há mais O<sub>2</sub> no mosto, caracterizando-se pela diminuição da multiplicação celular das leveduras. Essas, por processo enzimático, degradam os açúcares, transformando-os em etanol e água. Observa-se também, nesta fase, a formação de compostos secundários (álcoois superiores, aldeídos e ésteres), aumento acentuado de temperatura, queda do °Brix e aumento do grau alcoólico do mosto e;

- fermentação final, lenta ou pós-fermentação, etapa na qual ocorre a diminuição das bolhas, desprendimento de gás carbônico e retorno à temperatura ambiente. Ao final dessa etapa, o °Brix deve estar em zero, e a fermentação, concluída.

Em geral, o processo fermentativo tem duração de 24 horas. Após esse tempo, as leveduras depositam-se no fundo da dorna. O sobrenadante, cujo Brix deve ser igual a zero, é, então, retirado e levado para destilação. As leveduras são recicladas com adição de um novo mosto diluído a uma temperatura em torno de 30°C.

A melhoria da qualidade da aguardente de cana e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo. As leveduras, especialmente dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*, são responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto, em proporções bem variadas, em mostos

naturais de produtores mineiros (Pataro et al., 1998; Schwan & Castro, 2001; Pataro et al., 2002;). O uso de cepas selecionadas de *S. cerevisiae* na produção de aguardente de cana tem contribuído para o aumento da produtividade e melhorado a qualidade da bebida em muitos alambiques, principalmente em relação aos teores de acidez e álcoois superiores. Linhagens de *S. cerevisiae* isoladas em alambiques no estado de Minas Gerais foram submetidas a vários testes morfológicos, bioquímicos e moleculares, buscando-se obter isolados com boas características fermentativas e que prevaleçam na fermentação natural do caldo de cana-de-açúcar para a produção da aguardente de cana.

Silva et al. (2006) produziram quatro aguardentes de cana em escala de laboratório utilizando diferentes linhagens de leveduras *S. cerevisiae*, sendo duas floculantes (UFMGA 1240 e UFMGA 1799), uma não-produtora de H<sub>2</sub>S (UFMGA 1207) e uma linhagem de referência (UFMGA 905). Esses pesquisadores verificaram que todos os compostos analisados nas bebidas apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela Legislação Brasileira, com exceção dos álcoois superiores na aguardente obtida com a linhagem UFMGA 1207. Todas as aguardentes de cana apresentaram boa aceitação pelos julgadores nos testes sensoriais, e as amostras avaliadas não diferiram em relação aos atributos de sabor e impressão global.

Schwan & Castro (2001), em destilarias do sul de Minas Gerais, mostraram que espécies confirmadas, como *S. cerevisiae* foram testadas quanto à capacidade e à velocidade de produção de etanol a partir de sacarose, glicose e frutose, produção de ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e capacidade de floculação. Ao final dos testes, oito isolados de *S. cerevisiae* foram selecionados e submetidos ao acompanhamento da evolução da população microbiana durante o processo de fermentação espontânea. Três isolados foram selecionados, multiplicados e testados em alambiques comerciais por dois anos consecutivos. Pelos resultados, verificam-se um aumento da produtividade e

melhoria na qualidade do produto, principalmente em relação aos teores de acidez e álcoois superiores.

Gomes (2002), em destilarias próximas a Belo Horizonte, mostrou que duas linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* foram capazes de permanecer dominando a fermentação por até 30 dias consecutivos. Após esse período, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* apresentaram populações iguais ou superiores às inicialmente testada.

## **2.6 Destilação**

A destilação é um processo físico-químico que consiste da passagem da fase líquida de uma substância ou mistura, sob aquecimento, ao estado gasoso, condensando-se em seguida, permitindo, assim, separações químicas (Dias, 2006).

Após a fermentação, o mosto é levado à destilação em alambiques, cujo destilado apresenta composição química mais rica em compostos voláteis do que a fração líquida remanescente.

As características sensoriais da bebida alcoólica são diretamente influenciadas pelo processo de destilação, pois além de afetarem as quantidades relativas de congêneres, promovem algumas reações químicas induzidas pelo calor e, dependendo do tipo de reação, os componentes voláteis do vinho podem aumentar ou diminuir e, ainda, originar novos componentes. Algumas reações são bem conhecidas, como a hidrólise, a esterificação, a acetilização, a produção de furfural e as reações com o cobre (Guymon, 1974; Léauté, 1990). Segundo a Legislação Brasileira em vigor, conforme o primeiro parágrafo do artigo 88 do Decreto n. 2.314: “A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado apresente aroma e sabor provenientes da matéria-prima utilizada, dos derivados do processo fermentativo e dos formados durante a destilação” (Brasil, 1997).

Diversos fatores exercem influência sobre a composição química dos destilados, tais como: tipo do destilador, condições operacionais do aparelho, sistema de aquecimento e refrigeração, grau de purificação da mistura e a seleção das frações tomadas para inclusão na bebida destilada (Oliveira, 2001). Carnacini et al. (1989) mostraram que a concentração de células de leveduras no vinho a ser destilado influencia na composição química, no aroma e no corpo dos destilados, pois essas enriquecem os destilados principalmente com ésteres e com derivados de aminoácidos. Esses últimos, participam da formação de compostos importantes para composição do “flavour” da bebida destilada, tais como, álcoois superiores.

Os aparelhos utilizados na destilação podem ser descontínuos (alambiques de um, dois ou três corpos) e contínuos (colunas de destilação). Geralmente o material utilizado na confecção desses destiladores é o cobre, por ser um metal maleável, bom condutor de calor, resistente à corrosão provocada pelo fogo e pelo vinho e por influenciar positivamente na formação de sabor e aroma do produto. Bebidas destiladas nesses alambiques podem apresentar níveis elevados do metal, quando não é adequadamente higienizado. Segundo Faria & Pourchet-Campos (1989), a contaminação pelo cobre em bebidas se dá nas partes descendentes do alambique, com maior contaminação ocorrida na serpentina, pois o uso de serpentina de inox reduz drasticamente o teor de cobre.

Entretanto, posteriormente, Yokoya (1995) mostrou que a presença de cobre dentro dos padrões estabelecidos pela legislação é benéfica. Para ele, o metal atua como catalisador das reações de oxirredução, nas quais compostos sulfurados voláteis transformam-se em compostos insolúveis, enquanto a crosta cúprica formada no interior do destilador, exposta aos vapores dos destilados, catalisa a esterificação dos ácidos orgânicos pelo álcool, bem como a redução e a conseqüente remoção de sulfetos orgânicos e compostos sulfurados.

A destilação do vinho ou mosto origina o flegma (produto principal constituído de uma mistura hidroalcoólica e vários compostos secundários) e vinhaça (resíduo, constituído de todas as substâncias fixas do vinho com partes voláteis). O vinho possui composição complexa, apresentando componentes sólidos (açúcares não-fermentados, sais minerais, substâncias nitrogenadas, pectina, células de levedura e bactéria, bagacilho, argila), líquidos (água e álcool etílico, representando 99% do total) e gasosos (principalmente gás carbônico) (Yokoya, 1995).

O destilado é separado em três frações por meio de cortes, adotando os critérios de temperatura dos vapores no domo do alambique (para a fração cabeça) e o teor alcoólico do destilado (para encerrar a retirada da fração coração). Segundo Dias (2006), durante a destilação, os compostos são separados de acordo com a temperatura de ebulição característica de cada um. As frações do destilado são:

- cabeça: é a primeira fração recolhida na saída do alambique, correspondendo a 8-10% do destilado. Essa fração contém substâncias como metanol, acetaldeído, acetato de etila, possuindo grau alcoólico acima de 65°GL, devendo, portanto, ser desprezada;
- coração: é a segunda fração, correspondendo a 80% do destilado; é a aguardente de cana propriamente dita, que é recolhida até que o teor alcoólico atinja de 1,0 a 1,5°GL acima do que é estabelecido para ser engarrafada;
- cauda: é a terceira fração; também conhecida como “água fraca” e corresponde de 8% a 10% da fração total do destilado. Assim, como a fração-cabeça, ela deve ser desprezada.

O resíduo remanescente no alambique é chamado de vinhoto ou vinhaça e, atualmente, tem sido utilizado, de forma alternativa, na alimentação animal e na fertilização do solo (Evangelista, 2006).

Após a destilação da aguardente de cana, esta deve ser armazenada por um período de dois a três meses, em local fresco e protegido, evitando altas temperaturas, para que complete a formação do “buquê” (Brasil, 1997).

## **2.7 Componentes secundários**

Os componentes secundários são oriundos de reações que ocorrem durante os processos de fermentação, destilação e armazenamento em barris de madeira. Esses são constituídos de álcoois, hidrocarbonetos e compostos carbonilados com três ou mais átomos de carbono. Substâncias como cetonas, compostos fenólicos, aminas e compostos sulfurados também podem ser encontradas em pequenas proporções. (Maia & Nelson, 1994).

Os álcoois superiores são álcoois com mais de dois átomos de carbono formados durante o processo oxidativo ou a partir do metabolismo dos aminoácidos pelas leveduras (Galhiane, 1989). Os álcoois com até cinco átomos de carbono apresentam odores característicos (flavour) tradicionalmente associados com bebidas destiladas, destacando-se os álcoois amílico e propílico, e seus respectivos isômeros. Com o aumento do número de carbonos, o aroma modifica-se substancialmente e os álcoois tornam-se oleosos, sendo denominados de óleo fúsel, diminuindo o valor comercial e a qualidade da aguardente de cana (Maia, 1999). Segundo Cardoso (2006), estes compostos podem ser formados quando a cana é estocada, para depois ser moída. Outros fatores que contribuem para o aumento da concentração de álcoois superiores na bebida é a temperatura elevada durante o processo fermentativo e o pH muito ácido. Esses álcoois, assim como os ésteres e aldeídos, em quantidades normais são responsáveis pelo aroma e sabor característico da bebida.

O metanol é um álcool indesejável na bebida, devido a sua alta toxidez. Origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo presente na cana-de-açúcar, durante o processo de fermentação. Portanto, deve-se evitar uma

fermentação realizada na presença de frutas ricas em pectina, como laranja, maçã, abacaxi e também a presença de bagacilhos no caldo da cana a ser fermentado (Cardoso, 2006).

Os ésteres são formados pela reação de esterificação entre pequenas quantidades de etanol e ácidos carboxílicos, provenientes do processo de fermentação (Rose & Harrison, 1970; Pigott, 1989). Estes compostos quando presentes em pequenas quantidades incorporam um aroma agradável de frutas à aguardente de cana, porém em grandes quantidades, confere à bebida um sabor enjoativo e indesejado. O principal éster encontrado na aguardente de cana é o acetato de etila (Windholtz, 1976).

Os aldeídos, principalmente o acetaldeído, são formados pela ação de leveduras durante estágios preliminares do processo de fermentação, tendendo a desaparecer nas etapas finais, desde que o mosto sofra aeração. Outra forma de obtenção destes compostos é por meio da oxidação de álcoois superiores (Cardoso, 2006).

O furfural, aldeído cuja presença é indesejável na bebida, resulta da decomposição química de carboidratos. É formado, principalmente, pela pirogenização da matéria orgânica depositada no fundo dos alambiques. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, livre de substâncias orgânicas em suspensão. Essas, podem estar presente no caldo de cana-de-açúcar, quando a colheita for precedida da queima do palhiço. A presença de açúcares residuais ou bagacilho no vinho pode formar compostos indesejáveis, catalisados pelo aumento da temperatura e pelo pH ácido do vinho, desidratando os açúcares e hidrolisando celulose, hemicelulose e pectina, como também outros polissacarídeos do bagacilho, seguido da desidratação dos monômeros de pentoses e hexoses, originando furfural e hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente (Maia, 1994). Nas aguardentes de cana envelhecidas, o furfural pode ser oriundo da ação de ácidos sobre pentoses e seus polímeros

(hemiceluloses), podendo provir, pelo menos em parte, da madeira dos recipientes utilizados no armazenamento da bebida (Masson et al., 2007).

A acroleína, também conhecida como 2-propenal, é extremamente tóxica por todas as vias de administração e tem mostrado características mutagênicas, além de provocar irritação no trato respiratório de animais e humanos. Os vapores de acroleína são lacrimogênicos, muito irritantes aos olhos, nariz e garganta. O limite de percepção olfativa da acroleína no ambiente é de 0,21 mg/L e concentrações dez vezes maiores são consideradas perigosas à vida e à saúde. É formada durante o processo de fermentação, por meio da desidratação do glicerol, podendo estar associada a bactérias termofermentativas (Cardoso, 2006; Azevêdo et al., 2007). É um líquido amarelo que apresenta um sabor e odor amargo. Nos últimos anos, tem-se observado um considerável interesse por parte do World Health Organization (WHO), particularmente pela International Agency for Research on Cancer (IARC), para identificá-las e outros congêneres presentes em bebidas alcoólicas que podem ser carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos (Nascimento et al., 1997). Na aguardente de cana o seu limite é de 5 mg/100mL de álcool anidro.

O ácido acético também pode ser formado por meio da conversão do açúcar na presença de oxigênio e do levedo *Saccharomyces cerevisiae*. Quantidades elevadas desse ácido são freqüentemente associadas a práticas de estocagem da cana e contaminações do mosto com bactéria acética (Cardoso, 2006).

O carbamato de etila, substância altamente carcinogênica, é um contaminante orgânico, cuja quantificação em aguardentes de cana será exigida a partir de 2010 (Brasil, 2005). É encontrado naturalmente em baixas concentrações, em diferentes bebidas alcoólicas e em alguns alimentos fermentados. Sua origem e formação ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores acreditam que origina da degradação de aminoácidos, outros, que venha



de reações entre o etanol e o ácido cianídrico catalisado pelo cobre ou pela auto-oxidação de compostos insaturados induzidos pela radiação ultravioleta. Geralmente, sua formação envolve a reação entre o etanol e precursores nitrogenados, tais como uréia, fosfato de carbamila e cianeto (Mackenzie et al., 1990; Aresta et al., 2001; Boscolo, 2002). Diversos autores relatam sobre a quantificação dessa substância em aguardentes de cana. Andrade-Sobrinho et al. (2002) obtiveram concentração média de 770 µg/L em 126 amostras comerciais analisadas. Barcelos et al. (2007), trabalhando com diferentes aguardentes de cana do estado de Minas Gerais, encontraram níveis de carbamato de etila que variaram de não-detectado a 643,5 µg/L, com apenas uma região não atendendo à Legislação vigente (150 µg/L). Em vinhos e seus derivados, saquê, cervejas, licores, bebidas destiladas, como aguardentes de frutas, aguardentes de cana, uísque, são encontradas quantidades que vão de 5 a 1000 µg/L (ppb) e ocasionalmente excedem 1000 µg/L em alguns tipos de bebidas destiladas, segundo pesquisas realizadas pela *Food And Drug Administration* (FDA).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) caracterizam-se por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Apresentam alto potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico (Pereira-Netto et al., 2000).

Na Alemanha, "The German Society for Fat Science" fixou limites para o teor total de HPAs em alimentos e para o teor de HPAs de alta massa molecular (1,2-benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)pirileno e benzo(a)antraceno, sendo estes de 25 µg/L e de 5 µg/L, respectivamente. Segundo a legislação escocesa as concentrações máximas toleradas de HPAs em alimentos são de 1 µg/L para o naftaleno; acenafteno; fluoreno; fenatreno; antraceno e de 2 µg/L para o fluoranteno, pireno e criseno (Bettin & Franco, 2005). Apesar de não existir ainda Legislação Brasileira para HPAs, sua existência em bebidas já foi relatada. Serra et al. (1995) analisaram duas amostras de cachaça e identificaram a presença de benzo[a]pireno e de

benzo[a]antraceno, em que os níveis relatados da contaminação foram similares àqueles encontrados por Tfouni et al. (2007), sendo de 0.27 e 0.40µg/L, respectivamente. Bettin & Franco (2005) identificaram e quantificaram HPAs (naftaleno; acenaftaleno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno; pireno; 1,2- benzo(e)pireno; criseno; benzo(e)pireno; 2,3-benzo(a)antraceno; 1,2-benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; dibenzo(a,h)antraceno; benzo(a)pireno; benzo(ghi)pirileno) em vinte e oito amostras de aguardentes de cana. Os resultados experimentais para as amostras da bebida foram analisados em termos de análises de componentes principais (PCA), possibilitando a diferenciação entre o perfil das aguardentes de cana produzidas a partir de cana-de-açúcar queimada e não-queimada.

A presença de HPAs em alimentos deve-se principalmente à sua formação durante certos tipos de processamentos, como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, à poluição do ar e da água e à sua presença em solos. Em aguardentes de cana, além da queima da cana, a presença de HPAs pode ser proveniente de contaminações nas etapas do processo de produção, tais como o emprego de lubrificantes nos equipamentos, utilização de recipientes não-adequados para o armazenamento da bebida, tanques revestidos com resinas asfálticas ricas em HPAs, pelo açúcar adicionado à bebida e durante a maturação da bebida em tonéis de madeira tratada termicamente (Hawthorne et al., 2000; Zamperlinni et al., 2000).

## **2.8 Envelhecimento**

No Brasil, a aguardente de cana é o destilado mais consumido entre as bebidas alcoólicas nacionais. O hábito de envelhecimento está se tornando uma prática comum entre os produtores, que buscam agregar valores ao seu produto, tornando-o mais competitivo no mercado. Por meio do envelhecimento, pode-se obter produtos com melhor qualidade sensorial, inclusive de bebidas

provenientes de destiladores de aço inox. Dias et al. (2002) mostraram que, após estocagem em barris de madeira, praticamente não se detectam diferenças significativas entre aguardentes de cana destiladas em alambiques de cobre e de aço inoxidável.

De acordo com a Legislação vigente, a aguardente de cana/cachaça envelhecida refere-se à bebida que contiver, no mínimo, 50% de aguardente de cana/cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. Aguardente de cana/cachaça premium refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana/cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a um ano. Aguardente de cana/cachaça extra premium refere-se à bebida que contiver 100% de aguardente de cana/cachaça envelhecida em recipiente de madeira apropriado, com capacidade máxima de 700 L, por um período não inferior a três anos (Brasil, 2005).

Os recipientes utilizados para o envelhecimento são os barris e tonéis de madeira, que atuam como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de vapores de álcool e água, que ocorre em função das condições de umidade relativa e da temperatura do local de armazenamento. No entanto, as perdas ao longo do ano dependem de vários outros fatores, tais como dilatação e contração da aguardente de cana dentro do tonel, vazamentos e expulsão de aguardente por frestas e consequente aspiração de ar por contração no resfriamento em ocorrências sucessivas, devido à inadequação de instalações e de ambientes, além do modo de armazenamento.

Os barris empregados para o envelhecimento são termicamente tratados e, durante o processo de envelhecimento, diversos compostos são extraídos da madeira por influência da bebida, interferindo, assim, nas características organolépticas do produto final (Reazin, 1981). Portanto, para obter um produto de qualidade, parâmetros como a espécie da madeira, o tamanho, pré-tratamento

dos barris, condições ambientais e tempo de envelhecimento devem ser observados, pois esses irão influenciar nas interações entre a bebida e a madeira. Quando a bebida é envelhecida em temperaturas mais elevadas e em recipientes menores, há uma maior extração e, conseqüentemente, uma maior concentração de componentes da madeira. Segundo Trindade (2006), bebidas envelhecidas em ambientes cuja temperatura varia de 9 a 15°C e a umidade relativa é próxima a 73%, apresentam aroma mais fino e agradável.

A temperatura de armazenamento e o tipo de pré-tratamento sofrido pela madeira durante o processo de envelhecimento, geralmente reduz o teor alcoólico da bebida. Maia & Campelo (2006) mostraram que essas perdas de etanol podem ser reduzidas durante o envelhecimento, mantendo a temperatura da adega abaixo de 20°C e a umidade relativa do ar em torno de 85%. Entretanto, mesmo assim, pode ainda ocorrer uma perda de 1% ao ano. No Brasil, são comuns perdas de álcool em torno de 3 a 4% ao ano, seja pela qualidade dos tonéis utilizados, seja pela idade das madeiras em uso.

O tratamento térmico é o tratamento mais comum sofrido pela madeira durante o processo de envelhecimento. Esse termotratamento é necessário para dar forma aos barris, bem como para modificar as estruturas moleculares da madeira, causando a degradação de polímeros, tais como polissacarídeos e polifenóis, permitindo o aparecimento de novas substâncias aromáticas (ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, fenóis, etc), que conferem um sabor diferenciado às bebidas envelhecidas (Leão, 2006). No entanto, pesquisas anteriores realizadas por Campos et al. (2004), por meio das quais foram avaliadas as relações entre o tratamento térmico das madeiras (amburana e bálsamo) e as concentrações de fenólicos (ácidos vanílico e siríngico, siríngaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído) para o envelhecimento da cachaça mostrou que cada madeira necessita de condições específicas durante o tratamento, a fim de se obter uma extração mais efetiva dos compostos fenólicos presentes.

Mosedale & Puech (1998) citam que o uso das radiações ionizantes pode ser uma nova técnica para o tratamento dos tonéis e das madeiras para maturação e envelhecimento de bebidas, aumentando a taxa de extração e de reações entre os compostos, permitindo uma extração mais rápida desses. Urbain (1986) utilizou doses de radiação entre 100 e 150 Gy sobre conhaque, e observou que, na presença dessas, os conhaques obtinham um aroma e sabor equivalentes aos obtidos com três anos de envelhecimento natural. Estudos realizados no CENA/USP, com irradiação de cachaça com doses de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 Gy, mostraram que as cachaças irradiadas com as doses de 150 e 200 Gy obtiveram maior aceitação sensorial pelos provadores (Walder et al., 2004). Miranda et al. (2006) mostraram que a irradiação da cachaça e do tonel não exercia influência sobre a composição dos componentes voláteis; no entanto, esses pesquisadores observaram alterações no teor de aldeídos, taninos e cobre e no parâmetro cor. A aceleração do processo de envelhecimento foi confirmada por meio da análise sensorial.

Além das alterações de cor, sabor, aroma e teor alcoólico, observa-se também, durante o processo de envelhecimento, um aumento no teor de extrato seco, devido à extração dos compostos não-voláteis da madeira. A acidez volátil e a concentração de aldeídos também são acrescidas devido à oxidação do acetaldeído e do etanol. Outra reação que pode ocorrer é a esterificação dos álcoois e ácidos, produzindo ésteres, e levando as bebidas envelhecidas a apresentarem maiores concentrações dessas substâncias (Miranda et al., 2006).

### **2.8.1 Madeira**

A madeira é um material poroso, extremamente complexo e heterogêneo. É formada pelas reações de fotossíntese, tendo como monômero básico a glicose. A partir dessa, são originados todos os polímeros que a constituem (Mori et al., 2006).

A maioria das células que formam a madeira tem a função de sustentação mecânica e/ou de condução, variando de acordo com a espécie da árvore. As células com a função de sustentação ou condução de água são mortas na maturidade funcional e as células de armazenagem de substâncias nutritivas (parênquima) são vivas quando no estado funcional. A porção externa da madeira que possui essas células vivas do parênquima é denominada de albúrnio. No entanto, essas células morrem e o albúrnio transforma-se em cerne (Figura 2), o qual é formado pela deposição de taninos, gorduras, resinas e carboidratos, conferindo-lhe geralmente uma tonalidade mais escura, menor permeabilidade e maior resistência ao ataque de fungos e insetos em relação ao albúrnio. A relação cerne/albúrnio em uma árvore varia de espécie para espécie (Klock et al., 2005).

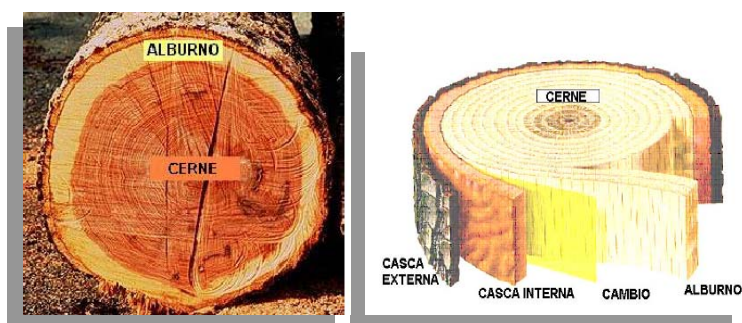


FIGURA 2 - Aspectos macroscópicos da madeira em uma seção transversal do tronco.

A composição química da madeira divide-se em substâncias macromoleculares e substâncias de baixo peso molecular. Na classe das macromoléculas, estão presentes a celulose (principal componente da parede celular, polímero linear constituído de  $\beta$ -D-glicose), polioses ou hemiceluloses

que se originam das hexoses (glicose, manose e galactose) e das pentoses (xilose e arabinose) e lignina (constituída por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano que irão dar origem aos fenóis, aos ácidos e aldeídos aromáticos). As substâncias de baixo peso molecular, que também são chamadas de materiais acidentais ou estranhos, são responsáveis, muitas vezes, por certas propriedades da madeira, como cheiro, gosto, cor, etc. Elas dividem-se em compostos de origem orgânica ou extrativos e compostos de origem inorgânica (Ca, K e Mg). Os primeiros dão origem aos taninos, responsáveis principalmente pela cor e adstringência da bebida, aos flavonóides, terpenos e ácidos graxos saturados e insaturados, principalmente na forma de seus ésteres com glicerol (óleo) ou como álcoois (ceras) (Klock et al., 2005).

No envelhecimento da bebida, a madeira sofre degradação pela ação do álcool e da água. Ocorre hidrólise da hemicelulose e da lignina, sendo que os produtos dessa hidrólise passam para o destilado (Sherev & Brink, 1980). Durante o envelhecimento da bebida, a hemicelulose é ligeiramente degradada em pentoses e hexoses, resultando no aumento da concentração de açúcares no produto final (Puech & Moutounet, 1988).

A lignina tem estreita relação com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos, porque libera para a bebida ácidos e aldeídos aromáticos durante o período de envelhecimento, sendo pequena fração é solúvel e, conseqüentemente, extraída durante o processo (Singleton, 1995). Esses compostos podem sofrer reações de oxidação, formando novos compostos aromáticos (Figura 3).

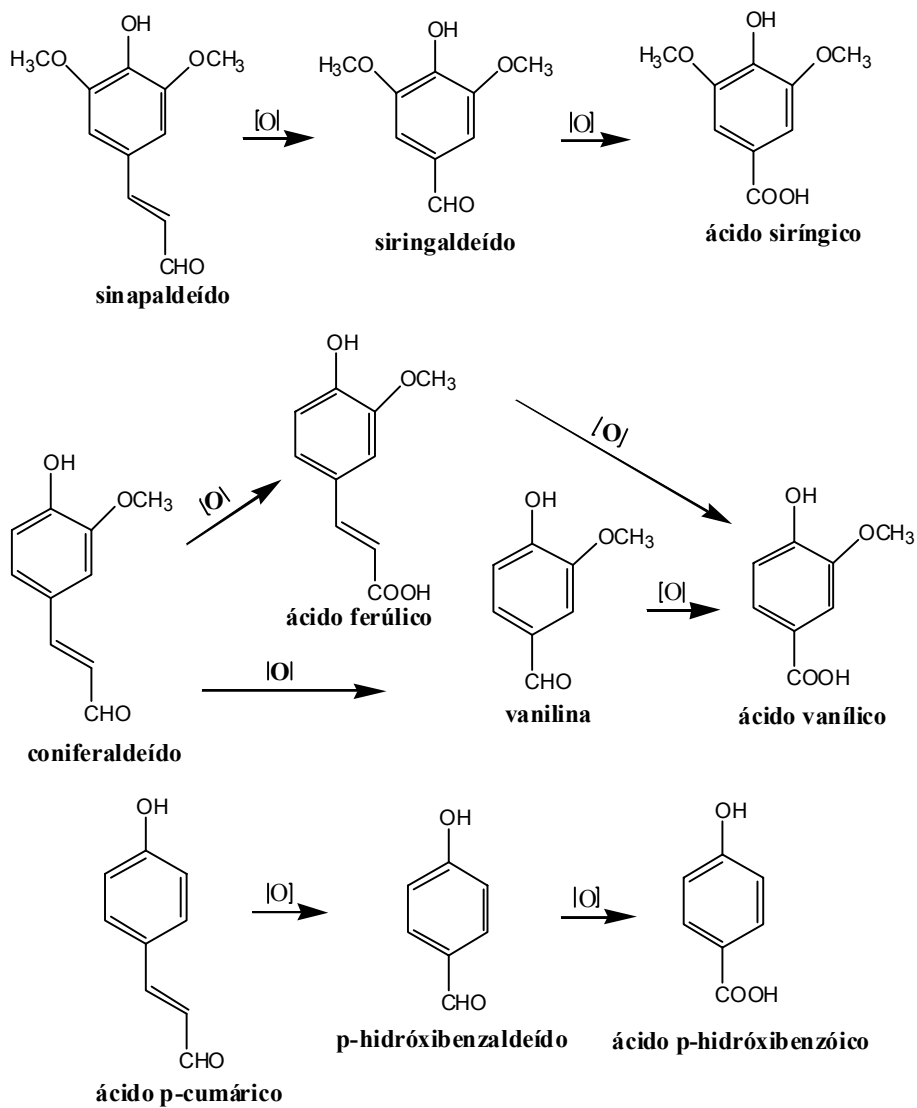


FIGURA 3 – Reações de oxidação dos compostos fenólicos.

Segundo Mori et al. (2006), a madeira utilizada para o envelhecimento da bebida deve apresentar certas propriedades, como:



- densidade – de maneira geral, a densidade da madeira apresenta variação natural de 0,13 a 0,14 g/cm<sup>3</sup>; essa variação ocorre em função da quantidade de matéria lenhosa por unidade de volume ou da quantidade de espaços vazios e da presença de incrustações por gomo-resina, cristais, sílica, etc, o que é intrínseco a cada espécie de madeira;
- cor – a variação da cor relaciona-se à impregnação de diversas substâncias orgânicas nas paredes celulares, sendo essas geralmente tóxicas a fungos, insetos e agentes marinhos xilófagos, fazendo com que a madeira apresente maior durabilidade. No entanto, essas substâncias são as principais responsáveis pela coloração das bebidas envelhecidas, podendo afetar positivamente ou negativamente propriedades, como cheiro, gosto, entre outras;
- cheiro – advém de certas substâncias voláteis presentes principalmente no cerne das madeiras. Para a confecção de barris ou tonéis de envelhecimento, é desejável que o cheiro seja imperceptível;
- gosto – esta propriedade está intimamente relacionada ao cheiro por ambos estarem acondicionados às mesmas substâncias. Portanto, para a utilização na confecção de barris e tonéis de envelhecimento, é desejável que o gosto seja imperceptível;
- permeabilidade – esta propriedade relaciona-se à densidade da madeira, uma vez que madeiras de alta densidade apresentam volume menor de espaços vazios. Portanto a madeira deve possuir baixa permeabilidade ou ser impermeável, a fim de evitar o vazamento da bebida estocada;
- resistência mecânica – é a propriedade de uma peça de madeira em se opor à deformação ou ruptura excessiva e relaciona-se diretamente à densidade da madeira. São indicadas para a confecção dos barris ou tonéis aquelas que apresentam resistência mecânica média à alta, pois eles necessitam de uma vida útil longa, estando sujeitos a vários esforços mecânicos;

- durabilidade natural - é o grau de suscetibilidade da madeira ao ataque de agentes destruidores, como fungos, insetos, brocas marinhas, etc. ou à ação das intempéries. Em geral, as madeiras de alta densidade apresentam essa propriedade e, no caso específico da bebida envelhecida, fatores, como utilização de ambientes internos, reações que ocorrem entre a madeira e a bebida durante o armazenamento, criam um ambiente repelente aos agentes destruidores que aumentam a durabilidade da madeira. Essa propriedade relaciona-se às demais características discutidas anteriormente, pois madeiras com baixa permeabilidade, alta densidade, alta resistência mecânica também apresentam alta durabilidade natural;

- trabalhabilidade – é definida como grau de facilidade ou dificuldade em se processar a madeira com ferramentas manuais ou mecânicas. As madeiras para envelhecimento devem ter boa trabalhabilidade.

Embora o Brasil possua atualmente várias espécies de madeira utilizadas para o envelhecimento, como amendoim (*Pterogyne nitens*), cerejeira (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaea carbouril*), ipê (*Tabebuia sp*), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático amarelo (*Plathynemia foliosa*) e jequitibá (*Carinian legalis*), os barris de carvalho-europeu (*Quercus sp*) ainda predominam, pois contemplam o maior número das propriedades citadas acima. No entanto, essa madeira é de difícil aquisição, uma vez que grande parte dos produtores reaproveitam barris que anteriormente foram utilizados para o envelhecimento de uísque, conhaque, vinhos etc. Outro entrave ao uso dos barris de carvalho é que não se encontram no mercado barris de distintas capacidades (Mori et al., 2003).

Estima-se que o Brasil possua cerca de 30 mil produtores de cachaça, sendo a maioria deles pequenos produtores. Isso implica uma variedade de madeiras que podem estar sendo utilizadas para o envelhecimento de aguardente

de cana. Por isso, há necessidade de estudos sistemáticos na caracterização de compostos extraídos de diferentes madeiras durante o processo de envelhecimento da bebida (Aquino et al., 2006a).

Uma das espécies que tem sido muito estudada quanto ao envelhecimento de aguardente de cana é a *Amburana cearensis* A.C. Smith pertencente à família Leguminosae Papilonoideae (Fabaceae) e popularmente conhecida como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru (Maia, 2004). Embora considerada nativa do sertão nordestino, a ocorrência de *A. cearensis* pode ser observada em praticamente toda a América do Sul (do Peru à Argentina), apresentando-se como uma árvore frondosa, podendo atingir até 15 m de altura, com flores brancas, vagem achatada e casca do caule vermelho-pardacenta cujo odor agradável é conferido pelas cumarinas presentes. Suas sementes são pretas, aladas e exalam forte cheiro de cumarina (semelhante à baunilha). No Nordeste o período de floração ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação se dá de agosto a outubro (Canuto & Silveira, 2006).

A castanheira ou castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma Lecythidaceae de ocorrência nos estados brasileiros do Acre, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia, assim como em boa parte do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. É bastante conhecida por sua amêndoa e sua madeira de lei. Sua madeira é de ótima qualidade para a construção civil e naval, bem como para esteios e obras externas. (Locatelli et al., 2003; Soares et al., 2004).

O jatobá (*Hymenaea courbaril* L.; Fabaceae - Caesalpinioideae) é uma árvore originalmente encontrada na Amazônia e Mata Atlântica brasileiras, ocorrendo naturalmente desde o Piauí até o norte do Paraná. Com altura entre 15 e 20 m e tronco que chega a 1 m de diâmetro, é uma planta considerada medicinal, em que várias partes são usadas. A madeira é empregada na construção civil, na confecção de artigos para esportes, cabos de ferramentas, peças torneadas, esquadrias e móveis (Lorenzi, 2002; Lorenzi & Matos, 2002).

O jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*) é uma árvore brasileira da família Lecythidaceae, originalmente encontrada no centro-sul do país, na Mata Atlântica. É considerada a maior árvore nativa do Brasil, podendo atingir até 50 metros de altura e um tronco com diâmetro de até seis metros. Possui uma madeira leve e macia ao corte; cerne geralmente róseo-acastanhado ou bege-rosado e alburno pouco diferenciado, bege-claro; possui textura média, uniforme; superfície irregularmente lustrosa e ligeiramente áspera ao tato; cheiro e gosto imperceptíveis. Sua madeira pode ser empregada para contraplacados, folhas fraqueadas, móveis e armação, acabamentos internos, saltos para calçados, brinquedos e lápis, cabos de vassoura etc (Lorenzi, 2002).

A espécie *Myroxylon balsamum* (L.) é uma árvore pertencente à família das Fabaceas e de ampla dispersão. Popularmente é conhecida como bálsamo, sua ocorrência vai do México à Amazônia e ao norte da Argentina, sendo cultivada ou explorada por sua madeira dura e resistente e para a produção do bálsamo-de-tolu, uma resina, semifluida muito utilizada em perfumaria, confeitaria e na fabricação de gomas de mascar, bem como ingrediente para produto expectorante, em veterinária e farmácia. No Brasil, aparece nos estados do Espírito Santo, Vale do Rio Doce e Zona da Mata (Minas Gerais), sul do estado do Mato Grosso e Goiás, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Maranhão, norte e oeste do estado do Paraná. Sua madeira é pesada e de cerne castanho, uniforme e de textura média. Possui cheiro característico balsâmico e agradável e seu gosto é levemente adstringente (Mainieri & Chimelo, 1989; Lorenzi, 1992).

O louro-canela (*Ocotea spp.*), pertencente à família Lauraceae, origina-se frequentemente nas matas periodicamente inundáveis do Estado do Amazonas. Possui cerne marron-amarelado, pouco diferenciado do alburno estreito, textura média, brilho moderado, cheiro característico quando recém-cortada, imperceptível quando seca, e gosto indistinto. Sua madeira é utilizada

na carpintaria, na construção civil em geral, peças torneadas, marcenaria, compensados, fabricação de móveis e na produção de laminados decorativos (Souza et al., 2002).

Dias et al. (2002), buscando caracterizar bebidas armazenadas em barris de madeira brasileira (amburana, bálsamo, jequitibá, jatobá e ipê), comparado ao carvalho, observou que, dentre as madeiras estudadas, a amburana foi a que mais se aproximou dos valores obtidos em barris de carvalho. Observaram que a bebida adquiriu uma coloração avermelhada, diferindo da coloração amarelo-dourado obtido com o carvalho. Os compostos fenólicos predominantes em cada madeira foram siringaldeído e ácido elágico no jatobá; ácidos vanílico e siringico e coniferaldeído no ipê; ácido vanílico e gálico no jequitibá; siringaldeído, vanilina e ácido elágico no bálsamo; sinapaldeído e ácido vanílico na amburana e ácidos gálico e elágico no carvalho.

Mori et al. (2003) avaliaram a potencialidade de 25 espécies de eucalipto e de 10 espécies nativas para o armazenamento de aguardente de cana. As análises químicas das madeiras de eucalipto e nativas mostraram composição semelhante em relação ao carvalho em termos de polissacarídeos e lignina, diferindo quanto ao teor de extrativos em relação ao carvalho. Quanto às análises físico-químicas das aguardentes armazenadas nos barris de eucalipto e de madeiras nativas, estas se encontraram dentro dos padrões de qualidade exigidos pelo MAPA. Quanto à coloração e tonalidade, as espécies de eucalipto que mais se aproximaram do carvalho foram *E. punctata*, *E. melanophloia*, *E. nesophylla*, *E. robusta*, *E. dunii*, *E. paeotricha*, *E. saligma* e *E. urophylla*. Dentre as madeiras destacaram-se a sassafrás, cerejeira, peroba do campo e jequitibá rosa.

Neste mesmo ano (2003), Faria e colaboradores avaliaram a utilização de oito madeiras brasileiras diferentes (amarelo, amendoin, bálsamo, jatobá, louro, pau d'arco, pau d'óleo e pereiro) e carvalho a fim de determinar

diferenças no teor de fenólicos totais e a aceitação sensorial da bebida. Pelos resultados verificou-se que as aguardentes de cana envelhecidas em barris de amendoin e pereiro, seguidos do jatobá, foram as que apresentaram características mais próximas das bebidas envelhecidas em carvalho e que as maiores mudanças nas propriedades sensoriais ocorreram nos primeiros 21 meses de envelhecimento.

Aguiar (2004), analisando aguardentes de cana envelhecidas em tonéis de carvalho durante oito anos, mostrou que além do cheiro característico da madeira, ocorreu uma intensificação na cor com o aumento dos anos de envelhecimento. Por meio das análises físico-químicas, observou-se um aumento na concentração do acetaldeído que foi atribuído à oxidação do etanol.

### **2.8.2 Compostos presentes em aguardentes de cana envelhecidas**

Os compostos responsáveis pelo gosto, aroma, sabor e flavor da aguardente de cana envelhecida são ácidos, aldeídos, taninos, óleos voláteis e outros compostos classificados como compostos fenólicos de baixo peso molecular. Esses pertencem a uma classe de compostos que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, pelo menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Dividem-se em fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas (Soares, 2002). Os principais compostos incorporados à aguardente de cana e que estão relatados na literatura estão descritos na Figura 4.

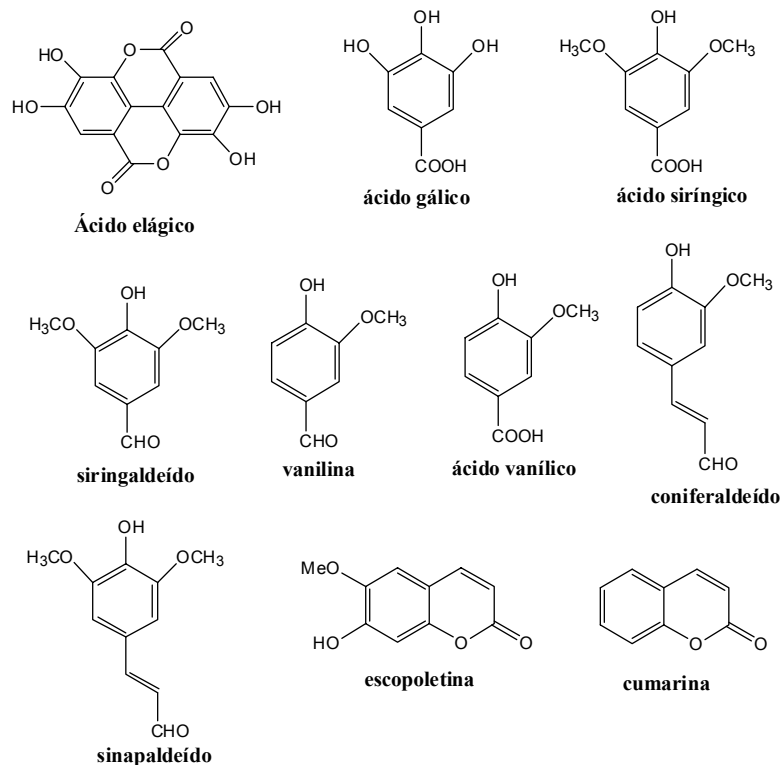


FIGURA 4 – Principais compostos fenólicos incorporados à aguardente de cana.

Os ácidos benzóicos possuem sete átomos de carbono (Ar-COOH) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metóxila na molécula (Figura 5). São pesquisados por conferir propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças. Como exemplo citam-se os ácidos siríngico, vanílico e o gálico (Soares, 2002).

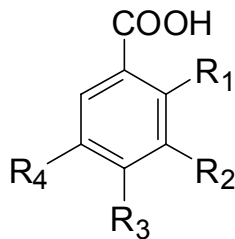
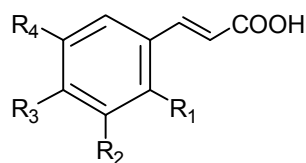


FIGURA 5 – Estrutura química dos ácidos benzóicos.

Os ácidos cinâmicos (Figura 6), também pertencentes à classe dos ácidos fenólicos, são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides ( $ArC_3$ ), compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático. Dentre os ácidos pertencentes a essa classe, destacam-se os ácidos cinâmico, o-cumárico, m-cumárico, p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico, como os ácidos mais encontrados no reino vegetal. Sua cadeia lateral pode sofrer redução, formando compostos como o eugenol ou perder átomos de carbono, originando derivados  $ArC_2$  e  $ArC_1$  ou sofrer ciclização, dando origem à classe das cumarinas. (Simões et al., 2004).



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$  (Ácido cinâmico);  $R_1 = OH$  (Ácido o-cumárico);  $R_2 = OH$  (Ácido m-cumárico);  $R_3 = OH$  (Ácido p-cumárico);  $R_2 = R_3 = OH$  (Ácido caféico);  $R_2 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$  (Ácido ferúlico);  $R_2 = R_4 = OCH_3$ ;  $R_3 = OH$  (Ácido sinápico).

FIGURA 6 – Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.



Alguns compostos fenólicos não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais. São encontrados sob a forma de polímeros, na qual encontram-se os taninos e as ligninas. Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água, de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, sendo responsável pelo progressivo escurecimento da cor do destilado com o envelhecimento (Singleton, 1995). São classificados em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis (Figura 7) e taninos condensados (Figura 8). Os primeiros são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glucose, cujas funções hidroxiladas são esterificadas com o ácido gálico. Os elagiotaninos possuem um ou dois resíduos de hexaidroxidifenoila de configuração (R) ou (S), os quais são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes. Após a hidrólise das ligações éster, ocorre a liberação do ácido difênico, que se rearranja espontaneamente, formando o ácido elágico (Queiroz et al., 2002).

Os taninos condensados perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores. Eles constituem a segunda fonte de polifenóis, perdendo apenas para a lignina. Sua estrutura é formada pela ligação de uma série de monômeros de unidades flavan-3-ol, ou por derivados desta (Queiroz et al., 2002).

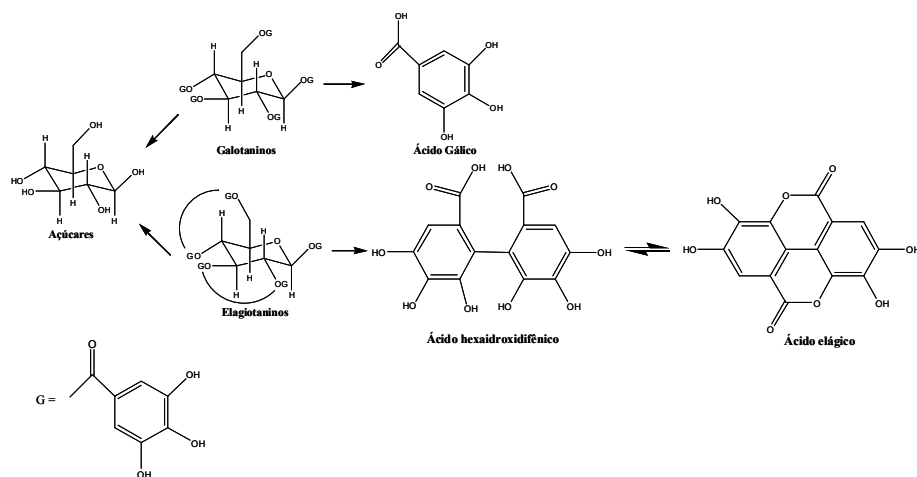


FIGURA 7 – Formação de taninos hidrolisáveis.

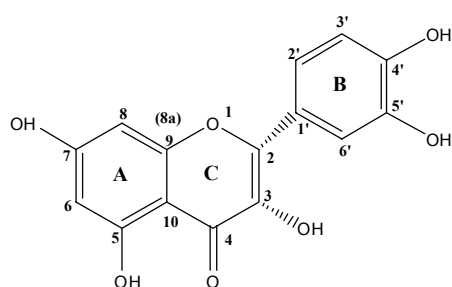


FIGURA 8 – Monômero básico para a formação dos taninos condensados (flavan-3-ol).

As ligninas são macromoléculas, constituídas de unidades básicas de fenilpropano (Figura 9). É um polímero complexo de grande rigidez e resistência mecânica, sendo que sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, apresentando estreita relação

com o desenvolvimento de aroma e sabor nos destilados envelhecidos (Miranda et al., 2006).

Segundo Masson et al. (1995), a lignina representa de 25 a 30% do peso seco da madeira. Possui a propriedade de se prender às fibras de celulose, bem como de ocupar os espaços intercelulares, tornando, assim, a parede rígida e impermeável. Sendo assim, ela constitui um polímero natural que apresenta grandes dificuldades para o estudo e conhecimento de sua estrutura química. A característica de heterogeneidade de suas moléculas é um importante fator que origina a grande variabilidade de composição de sua estrutura, entre as diferentes espécies do reino vegetal.

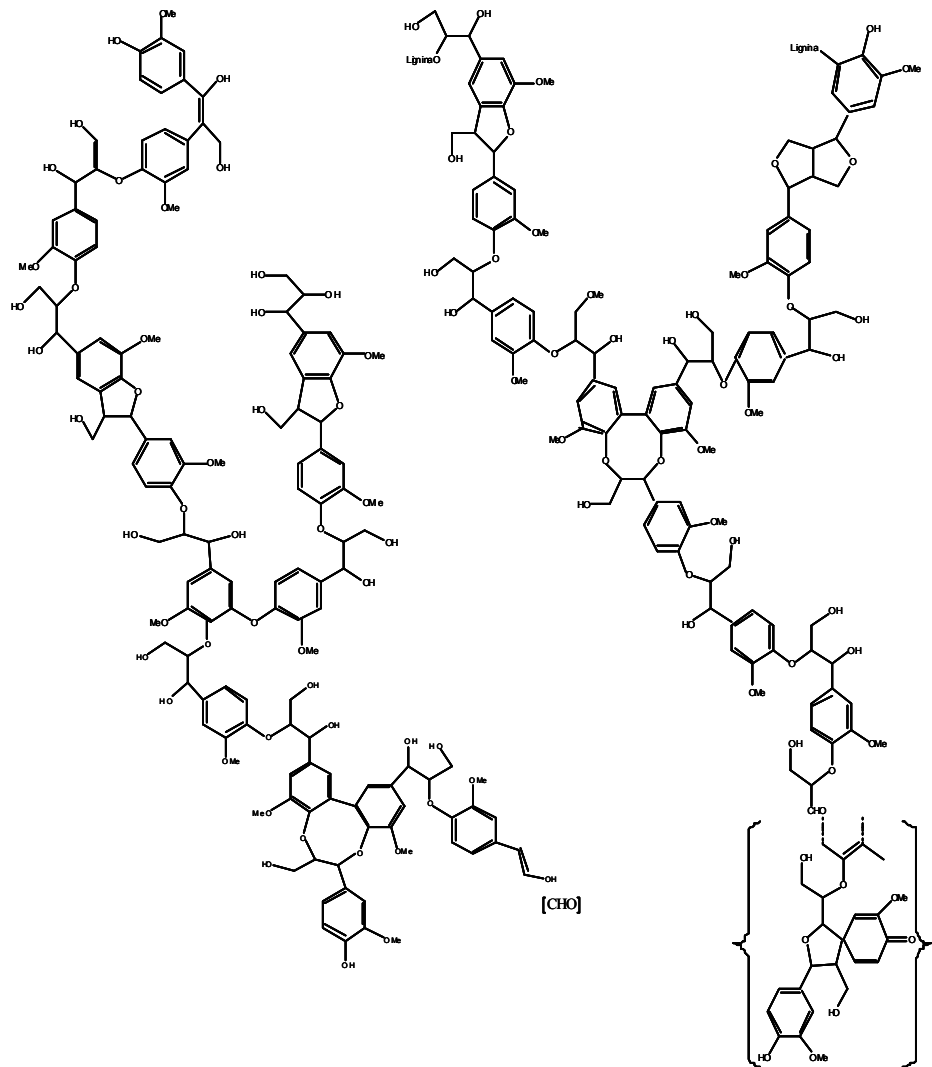


FIGURA 9 – Estrutura química da lignina.

Diante da complexidade da estrutura da lignina, ela pode ser constituída de diferentes precursores primários, como o álcool trans-coniferílico, o álcool

trans-sinapílico e o álcool trans-p-cumárico (Klock et al., 2005). Esses precursores estão representados na Figura 10.

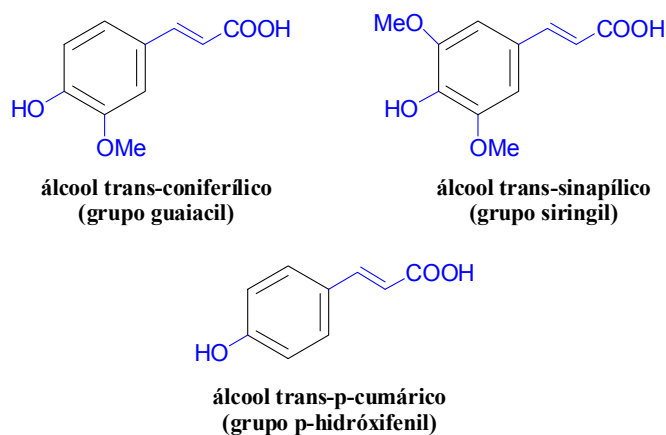


FIGURA 10 – Precursores primários da lignina.

Outra classe de compostos presentes nas bebidas destiladas são as cumarinas. Segundo Aquino et al. (2006b), sua presença indica longos períodos de estocagem nos barris de envelhecimento.

Esses compostos pertencem a uma classe de metabólitos secundários derivados não somente de plantas, mas também de fungos e bactérias. São originadas biossinteticamente pela lactonização ou ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (2-hidro-Z-cumárico) derivado da via do ácido chiquímico (Figura 11). Praticamente todas as cumarinas, com exceção da cumarina (1,2-benzopirona) propriamente dita, possui um substituinte hidroxilado na posição 7. A hidróxi-cumarina (umbeliferona) é a precursora das cumarinas 6,7-dihidroxiladas e 6,7,8-tri-hidroxiladas. Nessas, as hidroxilas podem ser metiladas ou glicosiladas. Também é comum a prenilação, isto é, a adição de grupos isoprênicos com 5, 10 e 15 átomos de carbono em várias posições do esqueleto cumarínico (Simões et al., 2004).

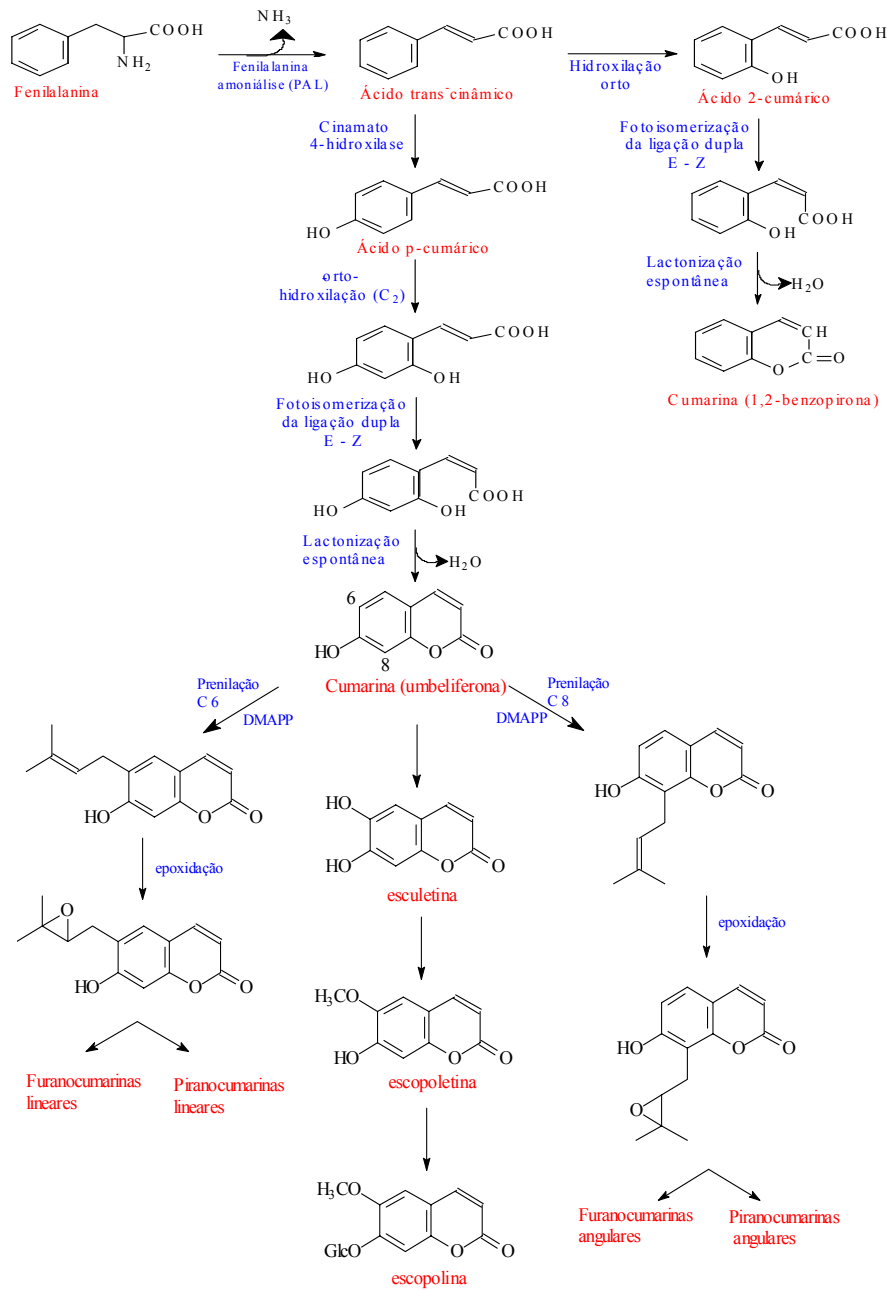


FIGURA 11 – Biossíntese das cumarinas (Simões et al., 2004).

O primeiro representante das cumarinas foi isolado por Vogel, em 1820, estudando a espécie *Coumarona odorata*. Esses metabólitos estão presentes em diferentes partes das plantas, tanto nas raízes como nas flores e frutos e podem estar distribuídos em diferentes famílias de Angiosperma, como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, nas quais são encontradas com ampla ocorrência. Também estão presentes em Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymelaceae, entre outras, em que suas ocorrências são menores. Dentre os táxons que biossintetizam cumarinas, estão espécies de hábitos bastante diversificados, como árvores, arbustos e ervas (Ribeiro & Kaplan, 2002). Segundo esses pesquisadores, as cumarinas dividem-se nas seguintes classes: cumarinas simples, furanocumarinas lineares, furanocumarinas angulares, piranocumarinas lineares, piranocumarinas angulares, lignocumarinas, biscumarina e triscumarinas. Para ele, na família Fabaceae (*Amburana cearensis*) são encontradas as cumarinas simples, furanocumarinas e as piranocumarinas lineares e angulares.

A 1,2-benzopirona (cumarina) foi largamente utilizada como aromatizante na indústria de alimentos, porém vários estudos apontam sobre seu grau de toxicidade para humanos. Com base em dados sobre toxicidade hepática verificada em ratos, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) a classificou como substância tóxica, passando a considerar sua adição em alimentos como adulteração (Federal Register, v. 19, p. 1239, 03/1954). Posteriormente seu uso foi banido na Europa (Simões et al., 2004). No Brasil, de acordo com o decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, proibiu-se a adição de cumarinas como flavorizantes em alimentos (Brasil, 1965). No entanto, alguns autores relatam a utilização dessa substância, em alimentos, tabaco e cosméticos como flavorizantes e realçador de fragâncias (Jager et al., 2007).

Na Europa, a concentração máxima de cumarinas permitida em alimentos e bebidas não alcoólicas é de 2 mg/Kg. Entretanto, em bebidas

alcoólicas e em certos caramelos confeccionados, o limite permitido é de 10 mg/Kg e, em goma de mascar, é de 50 mg/Kg (Lake, 1999).

Atualmente as cumarinas mais estudadas são a umbeliferona, escopoletina e a 4-metilumbeliferona (Aquino et al., 2006b). Embora haja várias técnicas analíticas disponíveis para a detecção de cumarinas, há dificuldades em sua determinação devido às baixas concentrações encontradas em bebidas alcoólicas e devido à limitada eficiência e resolução existentes nas técnicas analíticas. Segundo a Associação Oficial de Química Analítica, o método analítico oficial para determinar cumarinas em vinhos é a cromatografia em fase gasosa. Nas últimas décadas, vários autores têm utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação desses compostos (Salagoity et al., 1987; Puech & Moutounet, 1988; Izquierdo et al., 1996; Aquino et al., 2006b).

Outra técnica recentemente estudada é a determinação de cumarinas em bebidas alcoólicas por espectroscopia de fluorescência. Otsuka & Zenibayashi (1974) determinaram a concentração de escopoletina em bebidas alcoólicas por meio da espectroscopia de fluorescência. Posteriormente, Izquierdo et al. (2000) compararam os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrofluorimetria na detecção de três diferentes cumarinas (umbeliferona, escopoletina e 4-metilumbeliferona) em bebidas destiladas. Observou que ambas as técnicas se aplicam ao propósito, porém a espectrofluorimetria é mais sensível para a determinação das cumarinas.

Em trabalhos recentes de Jager et al., 2007; Raters & Matssek, 2008; Jager et al., 2008, verifica-se a utilização de técnicas analíticas hífenadas (cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida com detecção espectrométrica de massas) para a quantificação de cumarinas em alimentos, bem como, a utilização de tratamentos prévios como extração e microextração em fase sólida. Uma das vantagens de



utilização dessas técnicas é a alta sensibilidade obtida, permitindo detectar níveis bem inferiores aos obtidos com a cromatografia líquida com detector de UV.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, que podem ser feitas por partição (fase normal ou fase reversa), adsorção, troca iônica ou exclusão por tamanho. Esta técnica emprega uma pequena coluna aberta, usualmente denominada de cartucho de extração, contendo a fase sólida ou fase estacionária, onde é adicionada a amostra e em seguida o solvente de eluição (Lanças, 2004). Os mecanismos de retenção e eluição ocorrem por meio de forças intermoleculares entre o analito e a superfície da fase sólida, envolvendo interações do tipo van der Waals, eletrostática, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, íon-íon e ligação de hidrogênio. Essa técnica pode ser empregada para a concentração do analito (enriquecimento), isolamento da amostra (clean-up), isolamento da matriz ou estocagem de amostra.

Quanto aos demais compostos fenólicos, em diversos trabalhos, como o de Aquino et al. (2006b), relata-se sobre a presença deles em bebidas envelhecidas. Neste, o autor propôs uma metodologia para a determinação e quantificação simultânea de compostos presentes em aguardentes de cana envelhecidas. Empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de bebidas produzidas por pequenos produtores no Estado do Ceará, envelhecidas em diversas espécies de madeira comparadas a bebidas tipo exportação. Os compostos quantificados foram o ácido gálico, 5-hidróximetilfurfural, furfural, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e 1,2-benzopirona (cumarina). De acordo com os resultados obtidos, com exceção do 5-hidróximetilfurfural, o teor médio dos compostos analisados nas aguardentes envelhecidas dos pequenos produtores está de acordo com o teor médio encontrado para os produtos tipo

exportação. De acordo com este, alguns compostos fenólicos podem ser usados como marcadores ou indicadores do envelhecimento, desde que a quantidade durante o processo possa ser usada para estimar o tempo necessário para envelhecer a bebida destilada. No entanto, estudos anteriores de Izquierdo et al. (2000) mostram controvérsias quanto à presença de compostos fenólicos de baixo peso molecular ou de cumarinas indicarem o envelhecimento de vinhos e aguardentes em carvalho, pois o uso de caramelo e extratos de carvalho, que também contém estas substâncias, pode mascarar os resultados. Outros compostos considerados como marcadores do envelhecimento, como o furfural, 5-hidróximetilfurfural e 5-metilfurfural, foram também descartados por estarem presentes em caramelo e pelo fato de suas concentrações poderem ser afetados no processo de destilação (Onishi et al., 1977 e Quesada et al., 1996).

Souza et al. (2007) utilizaram a técnica de espectrometria de massas por ionização eletrospray no modo de íon negativo e por infusão direta, para avaliarem a presença dos principais compostos oriundos do processo de envelhecimento em aguardentes de cana armazenadas por 5 anos em tonéis de amburana, jequitibá, bálsamo e carvalho. As estruturas químicas dos principais componentes da cachaça foram propostas com base na comparação dos ânions gerados no espectro de massas com os ânions autênticos encontrados na literatura, e ainda pelo padrão de fragmentação dos ânions desconhecidos (Figura 12). Concluíram que por meio dessa técnica pôde-se distinguir cachaças envelhecidas em diferentes madeiras e monitorar mudanças na composição química com o tempo de envelhecimento.

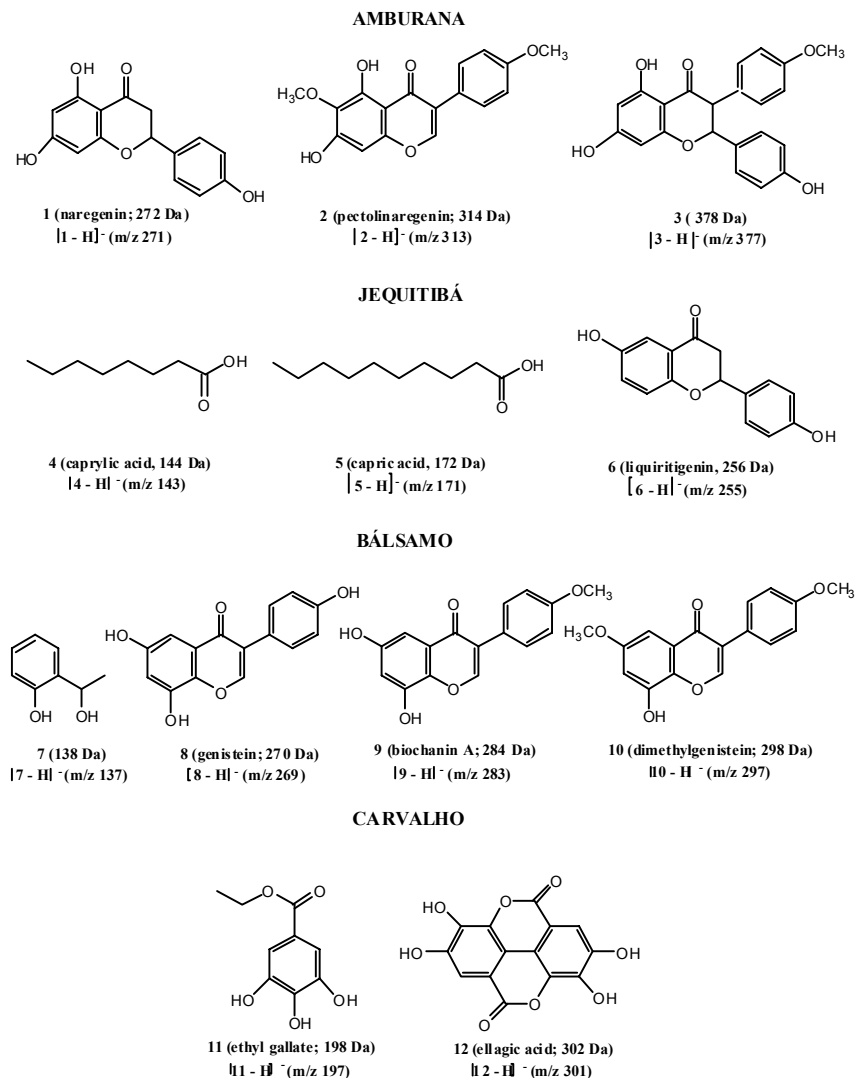


FIGURA 12 – Estruturas químicas propostas para os principais compostos detectados em cachaça envelhecida em tonéis de diferentes madeiras.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras

Foram coletadas na região Sul do Estado de Minas Gerais, doze amostras de aguardente de cana envelhecida, provenientes de diferentes barris de madeira com capacidades distintas. A Tabela 2 apresenta a origem, tipo de madeira, capacidade do barril e tempo de armazenamento de cada amostra.

TABELA 2 - Local de coleta e condições de armazenamento das amostras (madeiras, capacidade do barril e tempo de armazenamento).

<b>Amostra (codificação)</b>	<b>Local</b>	<b>Tipo de madeira</b>	<b>Capacidade do tonel/ barril (L)</b>	<b>Tempo de armazenamento (meses)</b>
L1	Lavras	Jequitibá	10.000	48
L2	Passa Quatro	Castanheira	700	36
L3	Passa Quatro	Carvalho	200	36
L4	Passa Quatro	Jequitibá	20.000	36
L5	Barbacena	Jequitibá	10.000	60
L6	Lavras	Amburana	10.000	48
L7	Piranguinho	Bálsamo	5.000	48
L8	Piranguinho	Louro canela	50.000	24
L9	Piranguinho	Carvalho	50.000	48
L10	Itajubá	Bálsamo	3.000	36
L11	Itajubá	Jatobá	4.000	6
L12	Itajubá	Carvalho	1.000	24

### **3.2 Análises físico-químicas**

Foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas no Departamento de Química da UFLA, segundo os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005 do Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Inicialmente as amostras foram redestiladas em triplicata e acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (-15°C). As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir.

#### **3.2.1 Exame organoléptico**

Foi determinado, observando-se as amostras contra um transluminador de luz branca, cujos parâmetros analisados foram: aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos e vazamentos (Brasil, 1997).

#### **3.2.2 Teor alcoólico**

Foi determinado por densimetria, sendo o resultado expresso em % em volume. As amostras foram redestiladas e o teor alcoólico obtido a partir de medidas a 20 °C, com o auxílio de um densímetro digital DensiMat Gibertini (Brasil, 1997).

#### **3.2.3 Extrato seco**

A análise foi efetuada por meio de métodos gravimétricos. Inicialmente, uma cápsula de alumínio foi previamente pesada em balança analítica. Em seguida, uma alíquota de 25 mL da amostra sem redestilar foi transferida para a cápsula e evaporada em banho-maria a 95°C, por 3 horas. Após esse período, levou-se à estufa a 100°C por 30 minutos e, posteriormente, o material foi resfriado em dessecador. O resíduo sólido remanescente foi pesado em balança

analítica (Marte/ AM - 220) e os resultados obtidos foram expressos em gramas de extrato seco por litro da amostra (Brasil, 1997).

#### **3.2.4 Acidez volátil**

Foi determinada por titulação volumétrica de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida por arraste de vapor, utilizando o Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini. Posteriormente, titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 mol/L em presença de fenolftaleína 1%. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra ou por 100 mL de álcool anidro (Brasil, 1997).

#### **3.2.5 Álcoois superiores**

A quantidade total de álcoois superiores foi determinada por meio de reação colorimétrica e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV-160-1PC a 540 nm. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A quantidade total desses compostos foi expresso em miligrama por 100 mL de álcool anidro (Brasil, 1997). As reações ocorridas nesse processo estão descritas no Anexo A, Figura 1A.

#### **3.2.6 Aldeídos**

Foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo 0,05 mol/L, titulando o SO<sub>2</sub> formado por meio das reações envolvidas na análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra ou por 100 mL de álcool anidro (Brasil, 1997). As reações referentes a esse processo estão descritas no Anexo A, Figura 2A.

### **3.2.7 Furfural**

A quantificação foi realizada por meio das leituras espectrofotométricas na região visível do espectro (Shimadzu UV-160-1PC) a 520 nm, por comparação das absorvâncias observadas nas amostras da bebida com valores de absorvâncias de uma curva analítica, previamente construída com soluções padrão de etanol/furfural. Para a análise de furfural, o grau alcoólico do destilado foi corrigido para 50°GL. Os resultados obtidos foram expressos em miligrama de furfural por 100 mL de álcool anidro (Brasil, 1997). A reação colorimétrica envolvida neste processo está descrita no Anexo A, Figura 3A.

### **3.2.8 Ésteres**

Os ésteres foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas bebidas. Suas quantidades foram expressas em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra (Brasil, 1997). As reações desse processo estão descritas no Anexo A, Figura 4A.

### **3.2.8 Metanol**

O metanol foi quantificado por reações colorimétricas e determinação no espectrofotômetro (Shimadzu UV-160-1PC) a 575 nm. As quantidades deste composto foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol. Os resultados obtidos foram expressos em mL de metanol por 100 mL de álcool anidro (Brasil, 1997). As reações decorrentes desse processo estão descritas no Anexo A, Figura 5A.

### **3.2.10 Cobre**

A quantificação do cobre presente nas aguardentes de cana foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas na região visível do espectro

(Shimadzu UV-160-1PC) a 546 nm, comparado a valores de absorvância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre como padrão primário. As reações coloriméticas foram realizadas nas amostras de cachaças sem redestilar (Brasil, 1997). Os resultados obtidos foram expressos em mg/L e as reações envolvidas nessa análise estão descritas no Anexo A, Figura 6A.

### **3.3 Contaminantes**

#### **3.3.1 Carbamato de etila**

As análises de carbamato de etila foram realizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa. O método empregado para a quantificação foi o CG/EM no modo de monitoramento de íons seletivos (SIM). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP5050A), ambos da marca Shimadzu. O monitoramento de íons seletivos foi empregado e os íons selecionados foram 62, 74 e 89 m/z. A coluna utilizada para a separação do carbamato de etila foi DB Wax 60 m x 0,25 mm x 0,50 µm.

Para as análises, utilizou-se o modo split (10:1), com a temperatura do injetor e do detector à 220°C. O hélio foi utilizado como o gás de arraste em um fluxo de 1,5 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 2 µL. A temperatura da coluna foi programada como segue: temperatura inicial de 90°C por 2 min seguida de uma rampa de aquecimento de 10°C/min até 150°C e a partir deste valor, uma rampa de aquecimento de 40°C/min até 220°C.

Para a quantificação empregou-se a técnica de padronização externa, preparando uma solução estoque de carbamato de etila (Acros Organics) (10,0 mg/L) em etanol 40%. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear plotando a área dos picos versus concentração e os limites de detecção (LD) e



quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica.

As amostras e as soluções da curva analítica foram analisadas em triplicata, sendo as primeiras previamente filtradas em membrana GV (Durapore) PVDF (0,22 µm x 12 mm).

### **3.3.2 Acroleína**

Para a quantificação da acroleína baseou-se na metodologia proposta por Nascimento et al. (1997), a qual consiste na derivação da amostra para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Os reagentes empregados para análise foram padrão de acroleína, metanol e acetonitrila grau HPLC, água ultra-pura, ácido sulfúrico, etanol absoluto e 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), sendo que essa última foi previamente purificada por três sucessivas recristalizações com metanol.

#### **3.3.2.1 Preparação da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína**

A reação para obtenção do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína está representada na Figura 13. Em um béquer, colocaram-se para reagir 0,4g de 2,4-DNPH e sobre esta adicionaram-se 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em seguida 3 mL de água destilada gota à gota, até a solubilização completa. Após, adicionaram-se imediatamente 10 mL de etanol 95%.

Em um outro recipiente, dissolveu-se 0,1g de acroleína em 20 mL de etanol. Em seguida, adicionou-se a solução preparada anteriormente, deixando a mistura em repouso aproximadamente por 15 min, até a formação de um precipitado. Filtrou-se e recristalizou-se duas vezes com etanol absoluto. A pureza foi confirmada por determinação da temperatura de fusão e análise elementar (C, H e N) (Anexo B) e por HPLC.

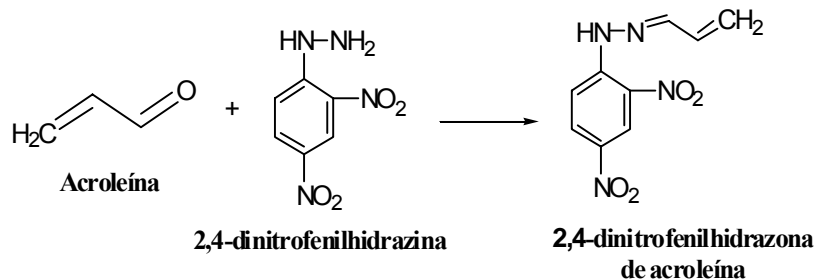


FIGURA 13 – Reação de formação da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína.

Para a análise quantitativa, a solução-padrão da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína foi obtida por sucessivas diluições da solução-estoque (1000 mg/L em acetonitrila) em solução de álcool 50%. A faixa de concentração para a construção da curva analítica foi de 0-20 mg/L.

### 3.3.2.2 Derivação da amostra

Uma solução 0,4% da 2,4-DNPH foi preparada dissolvendo 0,4 g em 100 mL de acetonitrila. Em um balão volumétrico, adicionaram-se 1 mL da solução de 2,4-DNPH, 4 mL da amostra (sem concentração prévia) e 50 µL de HClO<sub>4</sub>, consecutivamente. A solução resultante foi estocada à temperatura ambiente por aproximadamente 45 min, seguida pela filtração em membranas de polietileno 0,45 µm (Milipore) e injeção de 20 µL no HPLC.

### 3.3.2.3 Aparatos HPLC

Utilizou-se o equipamento UFLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20AD, um detector com arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, injetor automático com auto-amostrador modelo SIL-M20A, forno modelo CTO-20AC. As separações foram realizadas

empregando-se uma coluna empacotada Shim-pack VP-ODS (250 mm x 4,6 mm), com partículas esféricas de 5 µm conectada a uma pré-coluna Shim-pack VP-ODS (5,0 cm x 4,0 mm, 5 µm - Shimadzu).

#### 3.3.2.4 Análise quantitativa

A conversão quantitativa do aldeído nas bebidas destiladas em 2,4-dinitrofenilhidrazona é garantida pelo excesso de 2,4-DNPH empregado. A quantificação foi realizada utilizando-se o método de padronização externa, com detecção a 365 nm. A curva analítica foi obtida por regressão linear, plotando a área do pico versus concentração. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica. Na Tabela 3, estão apresentadas as condições cromatográficas utilizadas para análise.

TABELA 3 – Condições do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) para análise de acroleína.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solvente A (% v/v)</b>	<b>Solvente B (% v/v)</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>
0,01	30	70	365
3,00	30	70	365
5,00	15	85	365
7,00	10	90	365
9,00	30	70	365
12,00	30	70	365

Solvente A: água: ácido acético, 98:2% (v/v)

Solvente B: metanol (v/v)

### **3.3 Compostos fenólicos**

#### **3.3.1 Reagentes e padrões**

Os padrões empregados para análise foram ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, umbeliferona, ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido m-cumárico, cumarina, 4-metilumbeliferona, ácido o-cumárico, ácido elágico e eugenol, todos adquiridos da Sigma–Aldrich ou da Acros Organics. Todos os compostos químicos utilizados como solventes para cromatografia foram de grau analítico para HPLC: metanol (Merck) e ácido acético glacial (J.T. Baker) e água ultra pura obtida de um sistema Milli-Q.

#### **3.3.2 Preparação das amostras e padrões**

Os analitos foram quantificados pelo método de padronização externa. As curvas analíticas foram construídas por diluições da solução-estoque contendo  $1 \times 10^{-3}$  mol/L de cada padrão diluído em solução de etanol 50%. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de correlação mínimo de 0.995. Um total de 12 amostras de aguardentes de cana foram analisadas.

As amostras e os padrões foram filtrados em uma membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m e diretamente injetados dentro do sistema cromatográfico (Aquino et al., 2006b). As injeções foram realizadas em duplicata e a identidade dos analitos foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra comparados aos dos padrões.

#### **3.3.3 Condições HPLC**

O equipamento utilizado para as análises está descrito no item 3.3.2.3. A melhor condição de separação foi obtida após vários testes, em que a fase móvel, gradiente de eluição e temperatura da coluna foram avaliados. Os solventes de

eluição utilizados foram: solução de ácido acético 2% em água (fase A) e 70% metanol e ácido acético 2% em água (fase B). As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 4. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, o fluxo de 1,25 mL/min, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 60 min, realizada a uma temperatura de 40°C. A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. A quantificação foi realizada utilizando a padronização externa com concentrações que variaram de ácido gálico (0,51 - 13,61 mg/L), catequina (0,23 - 17,42 mg/L), ácido vanílico (0,13 - 10,09 mg/L), fenol (0,28 - 6,59 mg/L), ácido siríngico (0,08 - 11,89 mg/L), vanilina (0,06 - 9,13 mg/L), siringaldeído (0,07 - 10,93 mg/L), umbeliferona (0,06 - 9,73 mg/L), ácido p-cumárico (1,15 - 40,72 mg/L), ácido sinápico (0,18 - 13,45 mg/L), ácido m-cumárico (0,07 - 9,84 mg/L), cumarina (0,06 - 25,80 mg/L), 4-metilumbeliferona (0,38 - 10,57 mg/L), ácido o-cumárico (0,14 - 9,84 mg/L), ácido elágico (0,42 - 18,13 mg/L) e eugenol (3,28 - 16,40 mg/L).

TABELA 4 – Condições do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) para análise de dos compostos fenólicos.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solvente A (% v/v)</b>	<b>Solvente B (% v/v)</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>
25,00	60	40	280
43,00	40	60	280
50,00	0	100	280
55,00	100	0	280
60,00	100	0	280

Solvente A: água: ácido acético, 98:2% (v/v)

Solvente B: metanol:água: ácido acético, 70:28:2% (v/v).

### **3.4 Análise de cumarinas**

As cumarinas analisadas foram 1,2-benzopirona, umbeliferona, 4-metilumbeliferona. Essas foram quantificadas juntamente com os demais compostos fenólicos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência nas condições descritas anteriormente. Avaliou-se também a eficácia da extração em fase sólida para a quantificação destes compostos.

#### **3.4.1 Extração em fase sólida**

Para a extração, utilizou-se um cartucho C18-E (55  $\mu$ m, 70A) de 500 mg/6mL. Inicialmente ele foi condicionado com 5,0 mL de metanol, submetendo-o ao vácuo, com uma pressão de 20 KPa, sem tempo de secagem. Em seguida, passou-se pelo cartucho 5,0 mL de cada amostra, previamente acidificada (pH = 2) com uma solução de ácido fosfórico, eluindo-a com 1 mL de metanol. Avaliou-se a presença desses compostos na amostra que foi eluída do cartucho comparando-a com a amostra sem tratamento prévio.

### **3.5 Delineamento experimental**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Schott-Knott ao nível de 95% de confiança, usando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises físico-químicas

Os resultados obtidos por meio das análises físico-químicas estão representados na Tabela 5. Pode-se observar que, das amostras analisadas, 25% apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de ácidos e cobre e 83,33% quanto à presença de furfural.

Em diversos trabalhos, descreve-se sobre a avaliação físico-química de aguardente de cana no Estado de Minas Gerais. Estudos de Pereira et al. (2003) relataram sobre a presença de compostos secundários em quarenta e cinco amostras de cachaças provenientes de várias localidades do Estado de Minas Gerais, no período de agosto de 2000 a julho de 2001. Segundo os resultados obtidos, há diferenças bastante significativas entre as amostras analisadas quanto ao teor de acidez volátil, ésteres, aldeídos e álcoois superiores. Dentre as amostras analisadas, 24,44% das aguardentes encontravam-se fora dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação, por apresentarem excesso de álcoois superiores, aldeídos e acidez volátil.

Vilela e colaboradores (2007) avaliaram os teores de etanol, acidez volátil, aldeídos, cobre, ésteres, álcoois superiores totais e metanol, além dos álcoois propanol-1, 2-metil-propanol-1 e 3-metil-butanol-1 em cachaças artesanais da região Sul do Estado de Minas Gerais e de suas misturas. Todos os parâmetros analisados apresentaram-se dentro dos limites exigidos pela legislação, exceto o cobre, que apresentou concentrações acima de 5 mg/L para algumas amostras.

O teor alcoólico elevado observado na amostra L7 pode ser explicado pela utilização da bebida, na fabricação de blends, misturando-a com outras

cachaças mais fracas. Quanto aos teores alcoólicos inferiores ao permitido na legislação, para as amostras L10 e L11, pode-se relacionar às condições de armazenamento da bebida, tais como umidade, temperatura e porosidade do barril ou ao corte incorreto durante a etapa de destilação. Pesquisas de Maia & Campelo (2006) mostraram que as perdas de etanol podem ser reduzidas durante o envelhecimento, mantendo a temperatura da adega abaixo de 20°C e a umidade relativa do ar em torno de 85%. Entretanto, mesmo assim, pode ocorrer perda de 1% ao ano.

O alto teor de acidez volátil observado nas amostras L1 e L11 pode ser proveniente da contaminação do mosto por bactérias acéticas durante o processo de fermentação, pelo corte indevido das frações na etapa da destilação ou por oxidação dos álcoois e aldeídos, principalmente do etanol e do acetaldeído em ácido acético, durante o envelhecimento da bebida (Cardoso, 2006). Para Miranda et al. (2006), que analisaram físico-quimicamente e cromatograficamente cachaças irradiadas e não-irradiadas, por um período de 390 dias, constataram que não houve diferenças estatísticas significativas quanto ao teor de ácidos voláteis entre os tratamentos. No entanto, Parazzi et al. (2008) avaliando a composição química de aguardentes de cana armazenadas em tonéis de carvalho e em frascos de vidro, por um período de 36 meses, observaram um aumento significativo em todos os parâmetros analisados para as aguardentes armazenadas em tonéis de madeira. Quanto ao aumento gradativo da acidez nas amostras envelhecidas, os autores associaram a oxidação do acetaldeído, a incorporação de ácidos orgânicos não voláteis, de outros componentes secundários como os taninos e vários compostos fenólicos da madeira durante o processo de envelhecimento.

As concentrações obtidas nas amostras analisadas quanto ao teor de furfural variaram de 4,28 a 39,78 mg/100mL de álcool anidro. Pelos resultados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que a maioria das amostras



analisadas apresentam-se fora dos padrões de qualidade exigidos, exibindo valores acima do permitido pela legislação brasileira (5 mg/100mL de álcool anidro), exceto as amostras L4 e L8. O furfural é um aldeído indesejável na bebida, por ser considerado nocivo à saúde. A contaminação da bebida pode ocorrer por meio da degradação de pentoses durante as etapas de fermentação, destilação e envelhecimento da bebida. Outras possíveis formas de contaminação da bebida são por meio da requeima dos barris de madeira, no processo de envelhecimento e pela queima da cana durante a colheita.

Estudos realizados por Miranda et al. (2006), em cachaças armazenadas em tonéis de madeira, submetidos ao tratamento de irradiação por período de 390 dias, não mostraram influência do processo de envelhecimento na formação de furfural. Para esses, a presença do contaminante está relacionada ao processo de destilação.

Barcelos et al. (2007), analisando cachaças produzidas de cana não queimada, proveniente de três regiões do Estado de Minas Gerais (Zona da Mata, sul de Minas e Vale do Jequitinhonha), verificaram concentrações de furfural dentro do limite estabelecido pelo Mapa. Os autores atribuíram a formação do furfural à falhas durante o processo fermentativo.

Masson et al. (2007) quantificaram o furfural em amostras de cachaças produzidas com cana queimada e não queimada. Estes observaram que a queima do palhiço da cana-de-açúcar proporcionou um aumento significativo na concentração de furfural nas amostras analisadas. Segundo os autores, durante a queima, a exsudação do açúcar torna-se um excelente aderente ao colmo de resíduos da combustão, de partículas sólidas de solo, minerais e outros. No processamento da cana, esses resíduos são transferidos para o caldo e, em suspensão, vão para as dornas e posteriormente para o alambique, cuja matéria orgânica é transformada em furfural, chegando ao produto final.

Um problema comum que preocupa os produtores de aguardente de cana do Estado de Minas Gerais é o excesso de cobre nas bebidas. A presença desse metal se deve principalmente à dissolução do carbonato básico de cobre  $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3]$  presente nas paredes internas do alambique, pelos vapores ácidos da bebida. A contaminação pode ser evitada fazendo uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação (Cardoso, 2006) ou utilizando filtros com adsorventes como o carvão ativado e as resinas de troca iônica. Entretanto, recomenda-se um cuidado especial na utilização desses últimos, pois, alguns materiais retiram além do cobre substâncias importantes para o sabor e aroma da bebida, descaracterizando-a (Vilela et al., 2005; Anjos et al., 2005; Cantão, 2006 e Lima et al., 2006). Quanto à relação entre o envelhecimento da bebida e o teor de cobre alguns autores apontam o processo de envelhecimento como uma alternativa para a redução do metal na bebida. Cavalheiro et al. (2003) mostraram redução significativa quanto aos teores de cobre em sete amostras de cachaça, de diferentes procedências, antes e após o armazenamento em tonéis de carvalho com capacidade de 5L, por um período de seis meses. Resultados similares foram obtidos por Miranda et al. (2006), os quais atribuíram à redução do cobre a um possível processo de absorção ou de adsorção promovidos pela madeira, durante o processo de envelhecimento da bebida.

TABELA 5 – Análises físico-químicas das aguardentes de cana envelhecidas.

<b>Amostras</b>	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
<b>Análises</b>												
Grau alcohólico (%)	42,73 ± 0,11	41,95 ± 0,10	46,29 ± 0,07	43,61 ± 0,05	38,04 ± 0,06	42,92 ± 0,06	59,63 ± 0,18	47,68 ± 0,20	51,70 ± 0,13	37,04 ± 0,07	36,93 ± 0,25	38,02 ± 1,90
Densidade (g/mL)	0,9452 ± 1,9X10 <sup>-4</sup>	0,9465 ± 1,6X10 <sup>-4</sup>	0,9452 ± 1,9X10 <sup>-4</sup>	0,9388 ± 1,1X10 <sup>-4</sup>	0,9436 ± 7,6X10 <sup>-5</sup>	0,9528 ± 7,6X10 <sup>-5</sup>	0,9117 ± 1,1X10 <sup>-4</sup>	0,9362 ± 1,9X10 <sup>-4</sup>	0,9283 ± 2,8X10 <sup>-4</sup>	0,9543 ± 1,1X10 <sup>-4</sup>	0,9544 ± 3,68X10 <sup>-5</sup>	0,9527 ± 2,95X10 <sup>-3</sup>
*Acidez Volátil	165,10 ± 1,84	84,71 ± 3,54	37,83 ± 1,90	57,86 ± 1,99	86,64 ± 2,23	135,69 ± 4,01	34,01 ± 0,10	46,90 ± 1,98	75,44 ± 0,19	108,10 ± 2,63	181,63 ± 1,23	109,56 ± 4,89
*Aldeídos	7,46 ± 0,02	24,93 ± 0,07	15,46 ± 0,03	10,93 ± 0,13	16,77 ± 0,27	12,22 ± 0,15	21,15 ± 0,15	16,07 ± 0,53	21,35 ± 0,27	11,78 ± 0,16	12,21 ± 0,08	12,92 ± 0,19
*Álcoois Superiores	162,34 ± 9,08	176,90 ± 11,88	225,30 ± 13,03	164,69 ± 8,16	271,35 ± 6,93	171,74 ± 5,51	178,08 ± 4,32	199,40 ± 4,79	221,63 ± 6,18	204,24 ± 6,04	180,43 ± 4,02	185,94 ± 3,74
*Furfural	39,78 ± 1,04	25,10 ± 0,12	10,38 ± 1,14	4,66 ± 0,98	7,7 ± 0,25	23,98 ± 1,26	7,60 ± 1,40	4,28 ± 0,61	25,62 ± 1,07	11,99 ± 2,21	20,90 ± 1,25	12,01 ± 0,51
*Ésteres	114,54 ± 4,52	38,90 ± 4,41	37,86 ± 2,29	42,95 ± 1,19	69,09 ± 0,11	99,96 ± 1,19	43,07 ± 0,92	43,73 ± 3,96	56,69 ± 0,91	55,46 ± 3,66	71,17 ± 0,48	61,26 ± 2,50
*Metanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cobre (mg/L)	1,23 ± 0,03	1,14 ± 0,03	0,73 ± 0,02	3,13 ± 0,05	2,21 ± 0,06	1,67 ± 0,09	3,50 ± 0,04	2,86 ± 0,27	0,72 ± 0,04	5,60 ± 0,03	8,48 ± 0,13	4,32 ± 0,10
Extrato seco (g/L)	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,22 ± 0,004	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,39 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,22 ± 0,008
*Congêneres	449,46 ± 11,64	325,44 ± 16,06	316,46 ± 13,22	276,43 ± 9,36	443,85 ± 4,84	422,14 ± 6,94	276,32 ± 5,17	306,10 ± 8,99	375,11 ± 6,62	379,58 ± 3,89	445,44 ± 3,33	369,68 ± 5,64

\* unidade: mg/100 mL álcool anidro.

Congêneres = acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + álcoois superiores.

## 4.2 Contaminantes

### 4.2.1 Carbamato de etila

Para a quantificação do carbamato de etila, utilizou-se técnica de padronização externa e as curvas analíticas foram obtidas por regressão linear ( $y = 975050x + 2072,75$ ) plotando a área dos picos versus concentração. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9997. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica, cujos valores encontrados foram de 15,7 e 52,5  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

As concentrações de carbamato de etila presentes nas amostras de aguardente de cana analisadas estão descritas na Tabela 6.

TABELA 6 – Concentração de carbamato de etila nas amostras de aguardente de cana.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
<b>L1</b>	119,00	<b>L7</b>	67,70
<b>L2</b>	108,80	<b>L8</b>	71,50
<b>L3</b>	90,60	<b>L9</b>	64,90
<b>L4</b>	84,40	<b>L10</b>	75,10
<b>L5</b>	84,40	<b>L11</b>	68,10
<b>L6</b>	76,40	<b>L12</b>	64,80

Por meio dos resultados obtidos, pode-se observar que todas as amostras apresentaram níveis de carbamato de etila abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira (150  $\mu\text{g/L}$ ), sendo a maior concentração encontrada de 119  $\mu\text{g/L}$ .

Diversos autores relatam sobre a presença elevada desse contaminante em aguardentes de cana. Andrade-Sobrinho et al. (2002) observaram níveis elevados dessa substância em cachaças, utilizando 126 amostras comerciais, provenientes de vários estados. A concentração média obtida foi de 770 µg/L. Barcelos et al. (2007) avaliando amostras de aguardente de cana de três diferentes regiões do Estado de Minas Gerais (Sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Jequitinhonha) obtiveram valores que variaram de não detectado a 700 µg/L, encontrando um teor médio de 243 µg/L. Dentre as regiões estudadas, apenas as amostras do Vale do Jequitinhonha apresetaram níveis superiores ao estabelecido pelo MAPA para o contaminante em estudo. Estudos de Labanca et al. (2008), com 71 amostras de aguardente de cana provenientes de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, observaram teores médios de 893 µg/L. Segundo os autores, 35% das amostras apresentaram teores de carbamato de etila entre 500 e 1000 µg/L e 12% continham teores 10 vezes maiores que o estabelecido pela legislação. Assim, pode-se observar uma redução considerável no teor de carbamato de etila para as aguardentes de cana produzidas na região Sul de Minas Gerais em comparação com os resultados da literatura, pois a média encontrada neste trabalho foi de 81,31 µg/L. Esses resultados corroboram com os de Barcelos et al. 2007, os quais não encontraram níveis de carbamato de etila acima do permitido, nas cachaças provenientes do Sul de Minas Gerais.

Na Figura 14 comparam-se os valores de carbamato de etila e cobre obtido nas amostras analisadas.

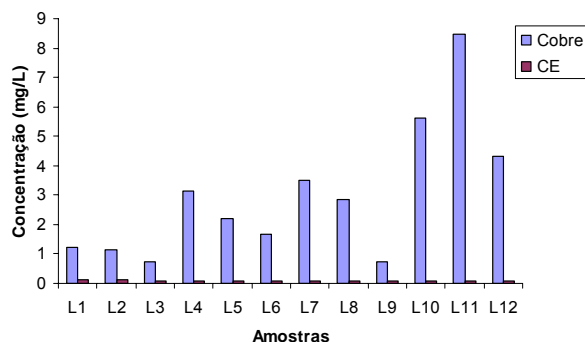
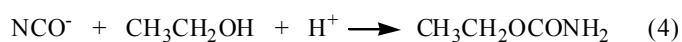
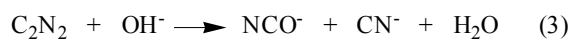


FIGURA 14 – Histograma dos teores de cobre e carbamato de etila (CE) nas amostras de aguardentes de cana.

Apesar de todas as amostras analisadas serem oriundas do processo de destilação em alambiques de cobre, não se observou correlação entre o material do alambique e teores elevados de carbamato de etila na bebida. Esses resultados condizem com os obtidos por Barcelos et al. (2007), em que a maior concentração de carbamato de etila foi encontrada nas aguardentes com menor teor de cobre. No entanto, contrariam o proposto por Aresta et al. (2001) que estudando a catálise do Cu(II) na conversão de cianeto à carbamato de etila, propôs que o cianato é formado na presença deste metal em meio básico. Segundo os autores, a formação de carbamato de etila a partir do etanol e cianato, relaciona-se diretamente a concentração de Cu(II) na bebida (equações 1 a 4). Em 2002, Andrade-Sobrinho e colaboradores observaram diferenças significativas quanto aos níveis de carbamato de etila em cachaças, quando partes ascendentes do sistema de destilação eram constituídas de cobre. Foram encontrados valores médios de 930  $\mu\text{g/L}$  para as amostras de cachaça produzidas utilizando colunas de destilação e de 630  $\mu\text{g/L}$  para as amostras provenientes de alambiques.



#### 4.2.2 Acroleína

A quantificação da acroleína foi realizada utilizando-se o método de padronização externa, com detecção a 365 nm. A curva analítica foi obtida por regressão linear ( $y = 133686,58x - 2471,76$ ), plotando a área do pico versus concentração. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9999. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica, cujos valores encontrados foram de 0,02758 e 0,09194 mg/100 mL de álcool anidro, respectivamente. A Figura 15 mostra o pico obtido para o padrão de 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína e a Figura 16, o pico correspondente para acroleína identificada em amostra de aguardente de cana.

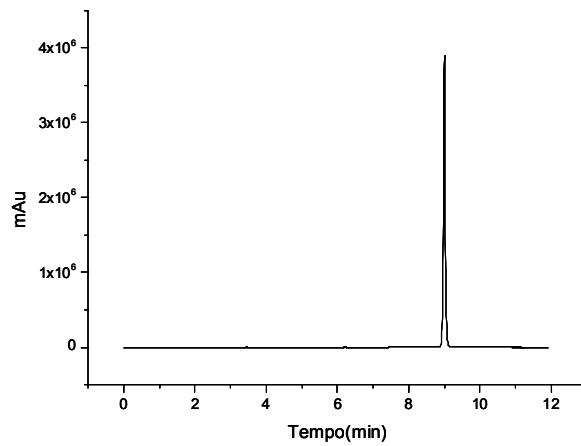


FIGURA 15 - Cromatograma do padrão da 2,4-DNPH de acroleína.

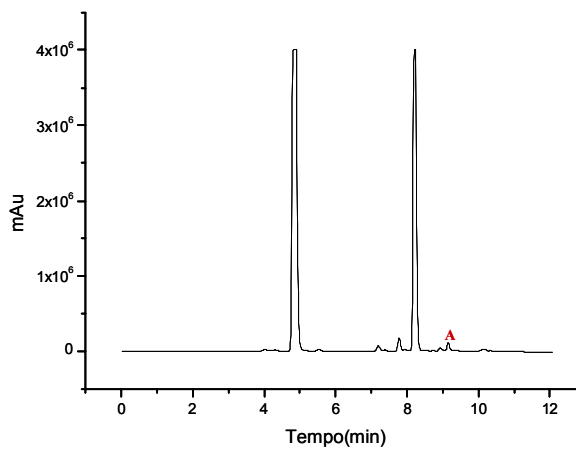


FIGURA 16 – Cromatograma da amostra de aguardente de cana. Pico identificado: A = acroleína.

As concentrações de acroleína presentes nas amostras de aguardente de cana analisadas estão descritas na Tabela 7.



TABELA 7 – Concentração (mg/100 mL de álcool anidro) de acroleína nas amostras de aguardente de cana analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração</b>	<b>Amostra</b>	<b>Concentração</b>
<b>L1</b>	ND	<b>L7</b>	$4,06 \pm 2,80 \times 10^{-2}$
<b>L2</b>	$0,07 \pm 1,84 \times 10^{-3}$	<b>L8</b>	$2,45 \pm 1,59 \times 10^{-1}$
<b>L3</b>	$0,05 \pm 2,80 \times 10^{-3}$	<b>L9</b>	$7,45 \pm 4,45 \times 10^{-1}$
<b>L4</b>	$2,82 \pm 6,70 \times 10^{-3}$	<b>L10</b>	$0,38 \pm 6,17 \times 10^{-3}$
<b>L5</b>	$1,62 \pm 1,81 \times 10^{-2}$	<b>L11</b>	$0,46 \pm 3,68 \times 10^{-3}$
<b>L6</b>	$2,88 \pm 1,46 \times 10^{-3}$	<b>L12</b>	$0,56 \pm 9,97 \times 10^{-3}$

ND = não detectado

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 7, pode-se observar valores para teores de acroleína de não-detectado a 7,45 mg/100 mL álcool anidro. Dentre as amostras analisadas, somente a amostra L9 apresentou-se fora dos padrões exigidos pela legislação brasileira, estando sua concentração acima do limite estabelecido de 5 mg/100 mL álcool anidro.

Observa-se na literatura poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em aguardentes de cana. Nascimento et al. (1997), analisando 56 amostras de aguardentes de cana oriundas de vários estados do Brasil, obtiveram concentrações que variaram de não-detectado a 0,660 mg/100mL de álcool anidro. Posteriormente, Nascimento et al. (1998), avaliando a influência da destilação de aguardentes de cana em alambiques confeccionados com cobre e aço inox, quanto à presença de álcoois, ésteres, ácidos, aldeídos e cetonas, não detectaram a presença de acroleína nas 3 amostras analisadas, provenientes de cada alambique. Em 2006, Braga avaliou a presença de acroleína em aguardentes de cana produzidas com três linhagens de leveduras com temperatura de fermentação controlada (20 e 32°C) e encontrou níveis inferiores

a 0,7 mg/100mL de álcool anidro para o contaminante. Esses valores relatados na literatura mostram-se bem inferiores aos resultados obtidos para a maioria das amostras analisadas no presente trabalho.

Para Azevêdo et al. (2007), esse contaminante pode ser formado durante o processo de fermentação da bebida, por meio da degradação do glicerol (Figura 17), podendo também estar associada à presença de bactérias termofermentativas (*Bacillus amaraerylus* e *Lactobacillus colinoides*). No entanto, esses mecanismos de formação da acroleína foram observados em cidras e vinhos, respectivamente.

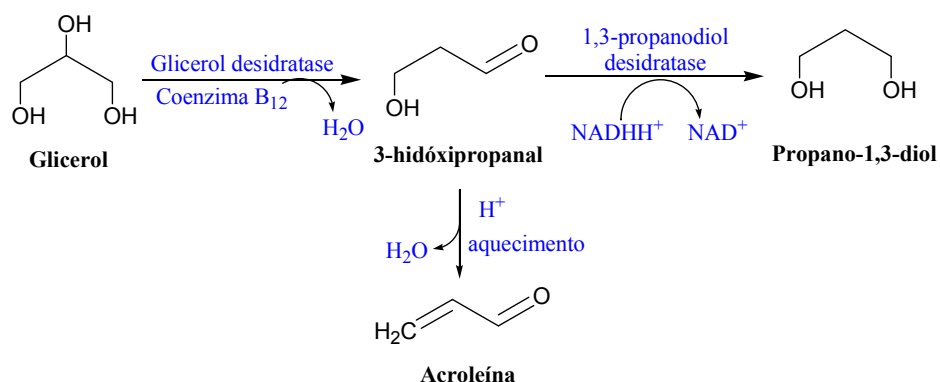


FIGURA 17 – Via metabólica de obtenção da acroleína. Adaptado de Azevêdo et al. (2007).

Portanto, diante da carência de informações na literatura sobre a forma de contaminação das aguardentes de cana para acroleína, estudos posteriores poderão ser realizados para avaliar as efetivas vias de formação desta substância na bebida.

### **4.3 Análise dos compostos fenólicos**

#### **4.3.1 Otimização do método analítico**

Conforme observado na literatura, Aquino et al. (2006b) desenvolveram uma técnica analítica para a determinação simultânea de 10 compostos (fenólicos e furânicos) em aguardentes de cana. O método envolveu a utilização de metanol: água: ácido acético como fase móvel e gradiente de eluição com fluxo de 1,25 mL/min.

Baseando-se neste trabalho, iniciaram-se estudos utilizando-se diferentes solventes para a fase móvel e diferentes temperaturas para a separação dos 16 compostos fenólicos propostos. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram fator de retenção ( $k'$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), e resolução ( $R$ ). Todas as definições dos parâmetros cromatográficos, bem como as equações utilizadas para os cálculos encontram-se no Anexo C.

Os analitos foram agrupados de acordo com sua absorvância máxima após a identificação da resposta ao comprimento de onda de cada composto, bem como sua intensidade e avaliação da forma de seu pico. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm. A Figura 18 ilustra o cromatograma com detecção espectrofotométrica obtido após injeção de 20  $\mu$ L de solução dos compostos fenólicos, em uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m - Shimadzu) conectada a uma pré-coluna Shim-pack VP-ODS (5,0 cm x 4,0 mm, 5  $\mu$ m - Shimadzu). O fluxo empregado foi de 1,25 mL/min a uma temperatura de 40°C, utilizando-se gradiente de eluição e duas diferentes fases, conforme descrito na seção 3.4.3.

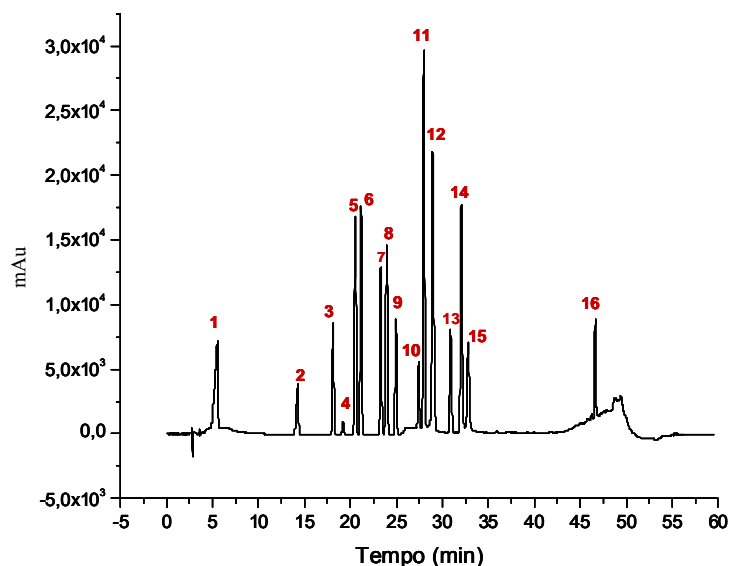


FIGURA 18 - Cromatograma da solução de compostos fenólicos com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido vanílico, (4) fenol, (5) ácido siríngico, (6) vanilina, (7) siringaldeído, (8) umbeliferona, (9) ácido p-cumárico, (10) ácido sinápico, (11) ácido m-cumárico, (12) cumarina, (13) 4-metil-umbeliferona, (14) ácido o-cumárico, (15) ácido elágico, (16) eugenol.

Na Tabela 8 estão indicados os tempos de retenção, os valores dos fatores de retenção e separação e a resolução obtida entre os picos para o método cromatográfico empregado.

TABELA 8 – Tempos de retenção ( $t_r$ ) e valores dos fatores de retenção ( $k'$ ) e separação ( $\alpha$ ) e da resolução (R) para o método empregado.

Picos	$t_r$	$k'$	$\alpha$	R
1	5,86	0,95	-	-
2	15,23	4,07	4,27	15,11
3	19,31	5,44	1,33	9,53
4	20,40	5,80	1,07	2,93
5	21,89	6,30	1,09	4,04
6	22,55	6,52	1,03	1,92
7	24,82	7,28	1,12	6,73
8	25,53	7,51	1,03	1,92
9	26,57	7,86	1,05	2,73
10	29,21	8,74	1,11	7,73
11	29,80	8,93	1,02	1,69
12	30,81	9,27	1,04	2,65
13	32,91	9,97	1,07	5,54
14	34,13	10,38	1,04	3,13
15	34,99	10,66	1,03	2,13
16	49,64	15,55	1,46	45,20

Tempo morto ( $t_M$ ) = 2,94; solvente = metanol + água.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 8, pode-se observar que o método proposto aplica-se a separação dos compostos fenólicos e cumarinas. Os fatores de retenção obtidos encontram-se dentro da faixa de 0,5 a 20, demonstrando a força eluente adequada da fase móvel. Portanto, quanto mais retido pela coluna for um componente, maior será esse fator. Os valores dos fatores de separação maiores que 1, aliados aos picos estreitos observados na

Figura 18, indicam a boa separação cromatográfica obtida pelo método proposto. Quanto à resolução, pode-se observar valores superiores a 1,5, atestando, assim, a qualidade da separação (Harris, 2001).

Buscando eliminar o ruído que aparece junto ao composto 16, iniciaram-se estudos variando o solvente da fase móvel (acetonitrila – ACNP1) e a temperatura da coluna (30°C – M30P1 e 35°C – M35P1), utilizando-se a mesma coluna cromatográfica, mesmo fluxo e mesmo gradiente de eluição do método empregado (Tabela 9). A mistura dos padrões foi injetada em triplicata para maior confiabilidade dos resultados. Observou-se que quando a acetonitrila foi utilizada como um dos constituintes da fase móvel, houve diminuição dos valores de resolução ( $R < 1,5$ ) entre os picos 6 e 7 (1,03), 7 e 8 (1,41) e 13 e 14 (0,28), comprometendo assim, a separação dos compostos. O mesmo foi observado para os picos 7 e 8 (0,86), 12 e 13 (0,79) e 13 e 14 (1,28) quando analisados à temperatura de 30°C e para os picos 7 e 8 (1,28), 9 e 10 (0,76) e 11 e 12 (0,90) quando analisadas a 35°C. Segundo Harris (2001), mudanças de solventes alteram a viscosidade e o poder eluente da fase móvel, ao passo que variações da temperatura influenciam diretamente os fatores de separação e resolução de compostos diferentes em uma mistura.

Dessa forma, utilizaram-se as condições testadas inicialmente, uma vez que elas, apresentaram melhor separação entre os compostos analisados.

TABELA 9 – Parâmetros cromatográficos (fator de retenção -  $k'$ , fator de separação -  $\alpha$  e resolução - R) obtidos quando se variaram o solvente de eluição (ACNP1) e as temperaturas (30°C – M30P1 e 35°C - M35P1).

Picos	ACNP1			M30P1			M35P1		
	$k'$	$\alpha$	R	$k'$	$\alpha$	R	$k'$	$\alpha$	R
1	0,93	-	-	1,29	-	-	1,15	-	-
2	3,46	3,72	15,62	4,97	3,85	21,16	4,61	4,01	17,54
3	4,26	1,23	7,67	6,36	1,28	10,31	6,01	1,30	9,95
4	4,65	1,09	4,80	6,64	1,04	2,18	6,35	1,06	2,76
5	5,68	1,22	13,33	7,22	1,09	4,60	6,89	1,08	4,38
6	6,06	1,07	3,83	7,43	1,03	1,80	7,11	1,03	1,93
7	6,17	1,02	1,03	8,16	1,10	6,32	7,87	1,11	6,71
8	6,29	1,02	1,41	8,57	1,05	0,86	8,34	1,06	1,28
9	6,52	1,04	3,06	8,83	1,03	2,18	8,65	1,04	2,67
10	6,72	1,03	2,48	9,11	1,03	2,22	9,48	1,10	0,76
11	6,97	1,04	3,20	9,88	1,08	2,70	9,85	1,04	2,97
12	7,34	1,05	3,66	10,28	1,04	3,02	9,97	1,01	0,90
13	7,72	1,05	3,60	10,39	1,01	0,79	10,84	1,09	5,59
14	7,78	1,01	0,28	10,53	1,01	1,28	11,39	1,05	4,22
15	8,41	1,08	3,04	11,29	1,07	7,68	11,84	1,04	3,17
16	14,04	1,67	34,24	16,33	1,45	41,11	16,29	1,38	41,14

ACNP1: tempo morto ( $t_M$ ) = 2,97; solvente = acetonitrila + água. M30P1: tempo morto ( $t_M$ ) = 2,93; solvente = metanol + água.

M35P1: tempo morto ( $t_M$ ) = 2,91; solvente = metanol + água.

#### 4.3.2 Certificação do método analítico

Os parâmetros avaliados para a validação do método analítico foram linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação. As definições desses parâmetros, bem como as equações utilizadas para os cálculos encontram-se no Anexo D.

Nas condições cromatográficas empregadas, observou-se que as amostras de aguardentes de cana não apresentaram substâncias interferentes nos tempos de retenção dos compostos analisados, mostrando, assim, a seletividade do método.

Para a quantificação dos compostos fenólicos e cumarinas, utilizou-se o método de padronização externa. As curvas analíticas das soluções dos compostos (Figuras 19 a 34) foram obtidas mediante diluições das soluções concentradas de ácido gálico (170,12 mg/L), catequina, (290,30 mg/L), ácido vanílico (168,15 mg/L), fenol (94,11 mg/L), ácido siríngico (198,17 mg/L), vanilina (152,10 mg/L), siringaldeído (182,18 mg/L), umbeliferona (162,14 mg/L), ácido p-cumárico (164 mg/L), ácido sinápico (224,21 mg/L), ácido m-cumárico (164 mg/L), cumarina (146,16 mg/L), 4-metil-umbeliferona (176,17 mg/L), ácido o-cumárico (164 mg/L), ácido elágico (151,10 mg/L) e eugenol (164 mg/L) em uma solução etanol-água 50%, obtendo-se soluções em um intervalo de concentração de 0,06 a 40,72 mg/L.

As equações das curvas analíticas foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo todos os padrões. Observam-se coeficientes de correlação superiores a 0,999 (Snyder et al., 1997), indicando forte correlação linear entre as concentrações das substâncias e as áreas dos picos, com exceção para os ácidos p-cumárico e elágico e eugenol, cujos coeficientes de correlação foram de 0,9989, 0,9983 e



0,9987, respectivamente. A Tabela 10 apresenta a linearidade e sensibilidade do método analítico, bem como os limites de detecção e quantificação obtidos.

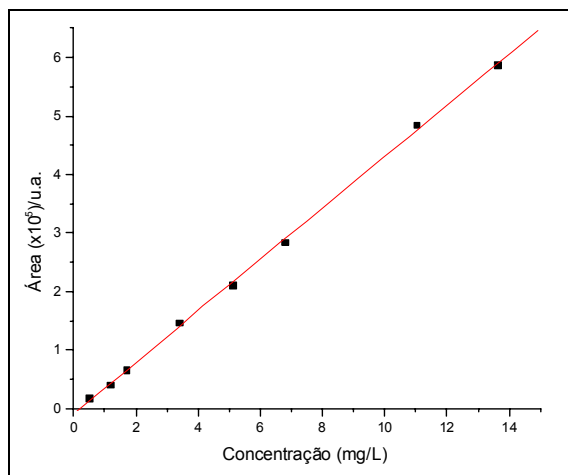


FIGURA 19 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido gálico. Equação da reta:  $y = - 8372,32 + 4,39 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9993.

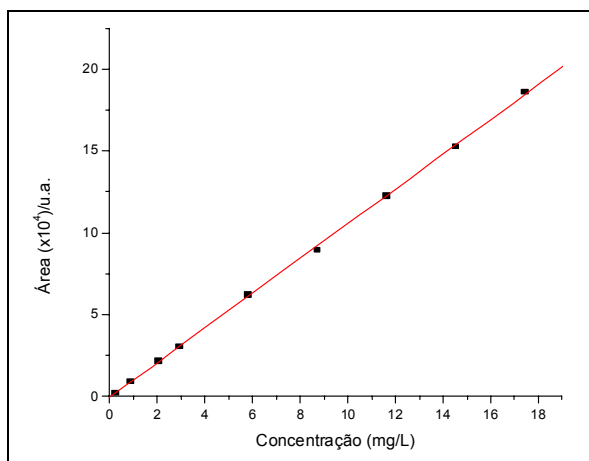


FIGURA 20 - Curva analítica obtida a partir das soluções de catequina. Equação da reta:  $y = - 490,18 + 1,06 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.

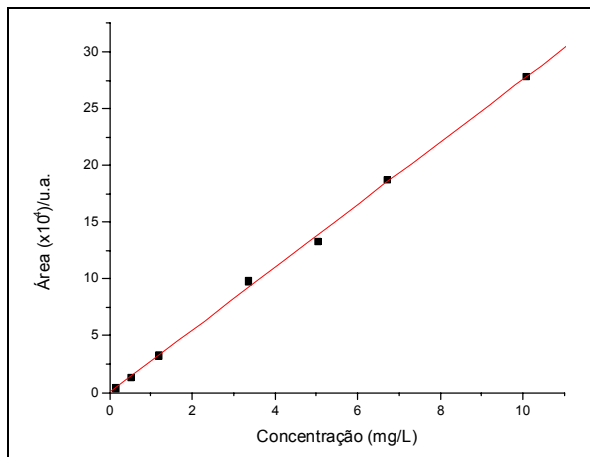


FIGURA 21 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido vanílico. Equação da reta:  $y = 293,40 + 2,75 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9990.

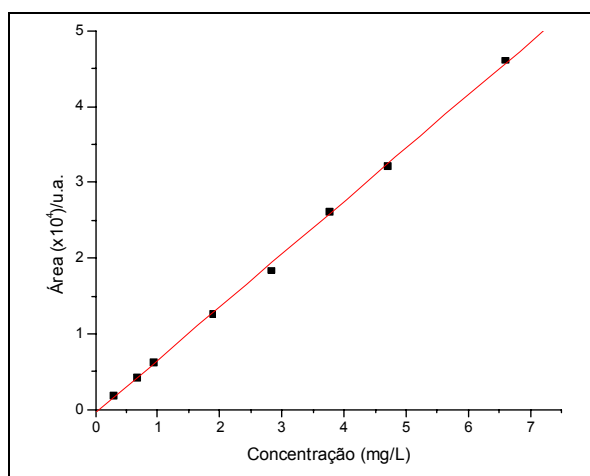


FIGURA 22 - Curva analítica obtida a partir das soluções de fenol. Equação da reta:  $y = - 486,48 + 7,01 \times 10^3 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9991.

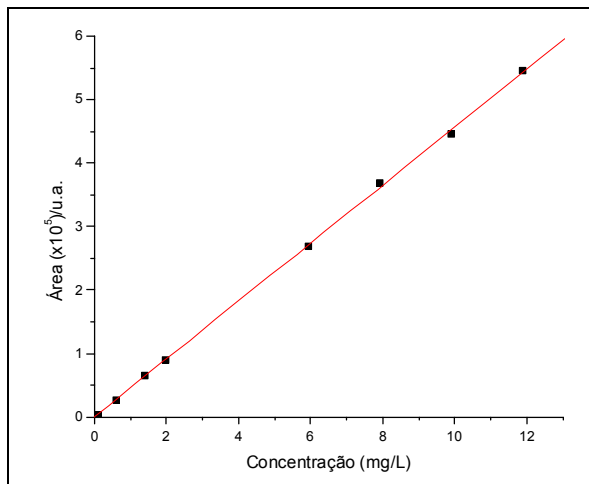


FIGURA 23 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido síngico. Equação da reta :  $y = 510,34 + 4,57 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.

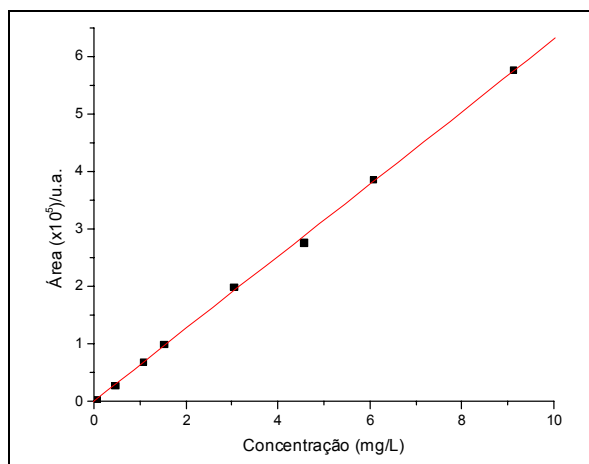


FIGURA 24 - Curva analítica obtida a partir das soluções de vanilina. Equação da reta:  $y = 996,25 + 6,29 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9992.

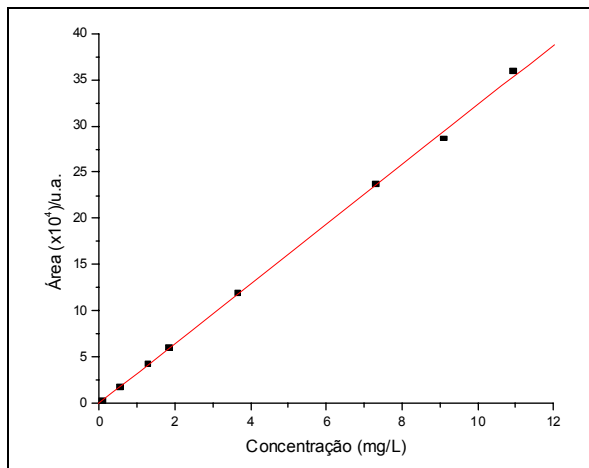


FIGURA 25 - Curva analítica obtida a partir das soluções de siringaldeído. Equação da reta:  $y = 184,04 + 3,23 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9992.

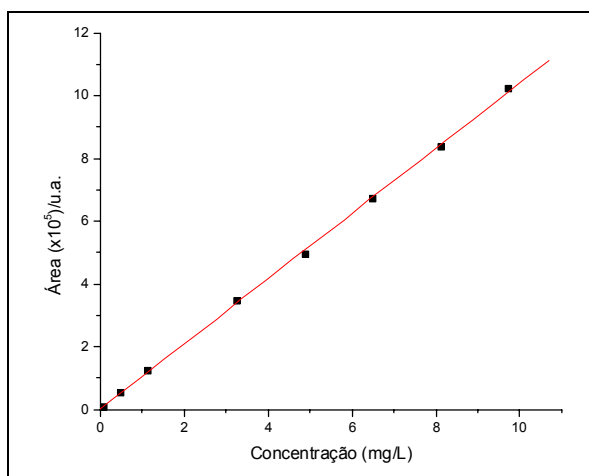


FIGURA 26 - Curva analítica obtida a partir das soluções de umbeliferona. Equação da reta:  $y = 2074,88 + 1,04 \times 10^5 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9996.

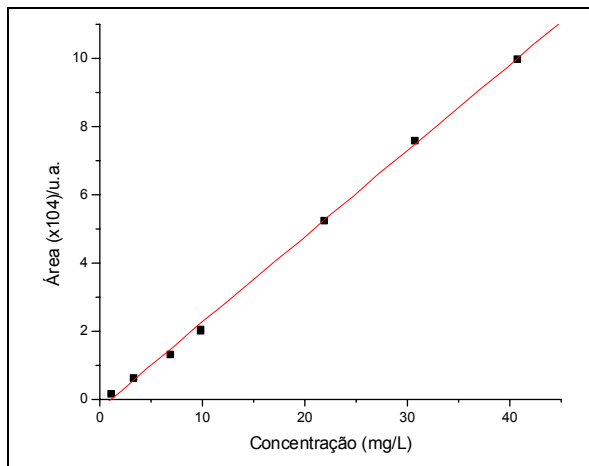


FIGURA 27 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido p-cumárico. Equação da reta:  $y = - 2797,20 + 2,52 \times 10^3 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9989.

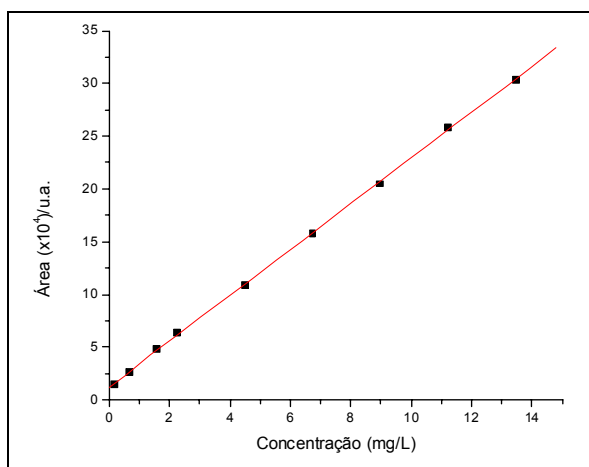


FIGURA 28 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido sinápico. Equação da reta:  $y = 12449,81 + 2,18 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.

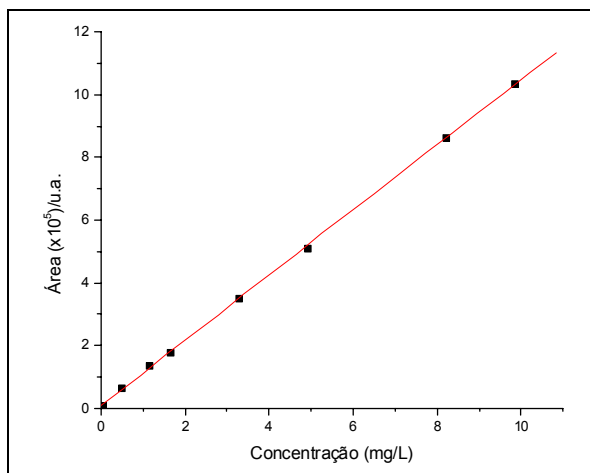


FIGURA 29 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido m-cumárico. Equação da reta:  $y = 8512,04 + 1,04 \times 10^5 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9997.

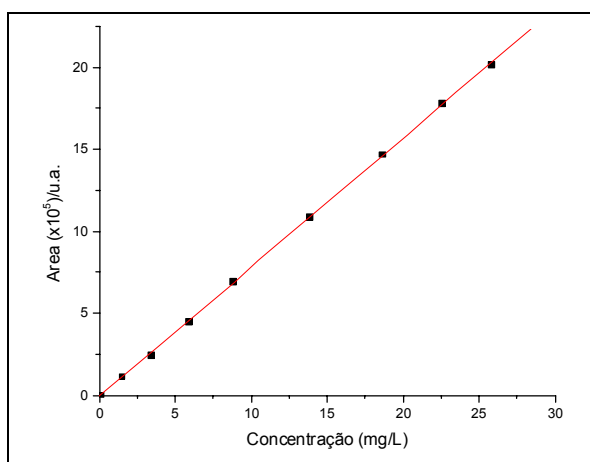


FIGURA 30 - Curva analítica obtida a partir das soluções de cumarina. Equação da reta:  $y = - 5465,37 + 7,88 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9998.

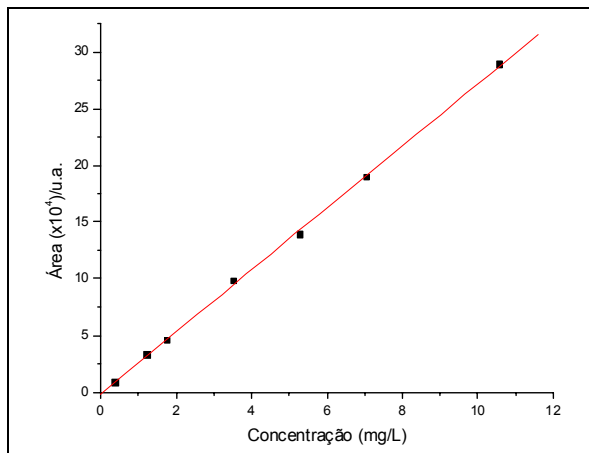


FIGURA 31- Curva analítica obtida a partir das soluções de 4-metilumbeliferona. Equação da reta:  $y = -1685,99 + 2,73 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9995.

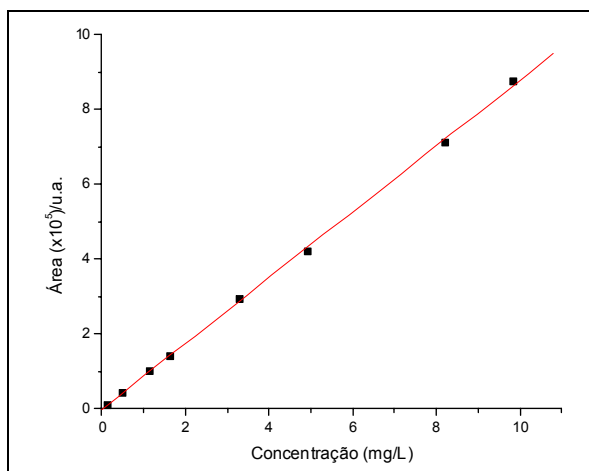


FIGURA 32 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido o-cumárico. Equação da reta:  $y = - 847,83 + 8,78 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9994.

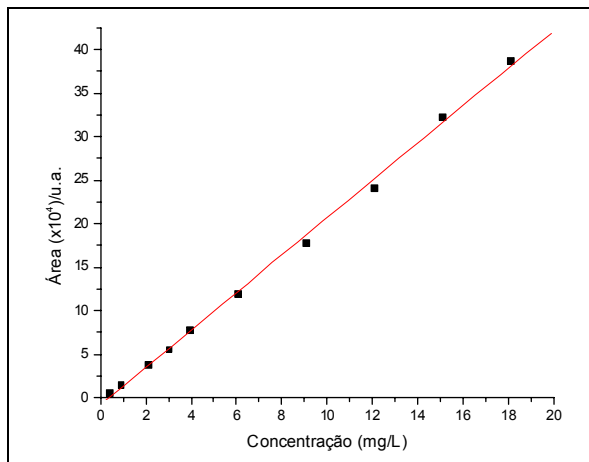


FIGURA 33 - Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido elágico. Equação da reta:  $y = - 7796,20 + 2,14 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9983.

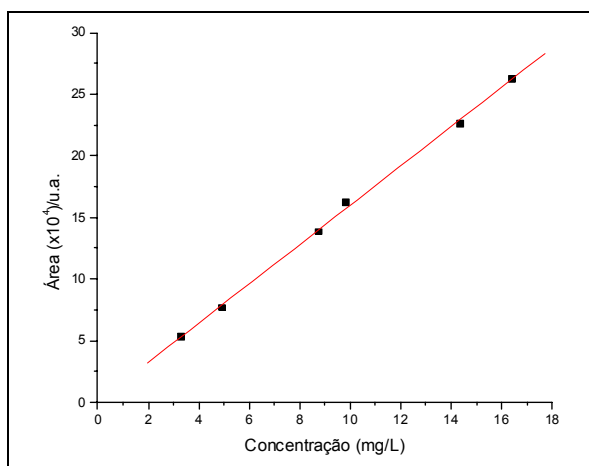


FIGURA 34 - Curva analítica obtida a partir das soluções de eugenol. Equação da reta:  $y = 738,40 + 1,59 \times 10^4 x$ . Coeficiente de correlação linear = 0,9987.



TABELA 10 – Linearidade, sensibilidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos compostos.

<b>Composto</b>	<b>Linearidade mg/L</b>	<b>Sensibilidade mAu mg/L</b>	<b>LD mg/L</b>	<b>LQ mg/L</b>
Ácido gálico	0,51 - 13,61	$4,39 \times 10^4$	0,05	0,28
Catequina	0,23 - 17,42	$1,06 \times 10^4$	0,09	0,21
Ácido vanílico	0,13 - 10,09	$2,75 \times 10^4$	0,03	0,10
Fenol	0,28 - 6,59	$7,01 \times 10^3$	0,07	0,27
Ácido siríngico	0,08 - 11,89	$4,57 \times 10^4$	0,02	0,08
Vanilina	0,06 - 9,13	$6,29 \times 10^4$	0,01	0,06
Siringaldeído	0,07 - 10,93	$3,23 \times 10^4$	0,04	0,07
Umbeliferona	0,06 - 9,73	$1,04 \times 10^5$	0,04	0,06
Ácido p-cumárico	1,15 - 40,72	$2,52 \times 10^3$	0,13	1,09
Ácido sinápico	0,18 - 13,45	$2,18 \times 10^4$	0,09	0,18
Ácido m-cumárico	0,07 - 9,84	$1,04 \times 10^5$	0,05	0,07
Cumarina	0,06 - 25,80	$7,88 \times 10^4$	0,01	0,05
4-metilumbeliferona	0,38 - 10,57	$2,73 \times 10^4$	0,07	0,37
Ácido o-cumárico	0,14 - 9,84	$8,78 \times 10^4$	0,01	0,14
Ácido elágico	0,42 - 18,13	$2,14 \times 10^4$	0,24	0,41
Eugenol	3,28 - 16,40	$1,59 \times 10^4$	1,15	3,28

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, pode-se observar que o intervalo linear medido foi de 0,06 a 40,72 mg/L. Observa-se também valores de sensibilidade obtidos por meio da inclinação da curva analítica; quanto maior a inclinação maior a sensibilidade. O limite de detecção (LD) foi definido como a concentração cuja resposta foi três vezes a relação sinal/ruído e o limite de quantificação (LQ), considerou a relação sinal/ruído 10:1 (Snyder et al., 1997 e Aquino et al., 2006b). Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos fenólicos variaram de 0,01 a 1,15 mg/L e 0,05 a 3,28 mg/L, respectivamente. Os valores obtidos mostraram-se inferiores aos relatados por Aquino et al. (2006b), que encontraram LD e LQ de 0,12 e 0,50 mg/L para o ácido gálico, ácido vanílico e ácido siríngico, 0,08 e

0,25 mg/L para vanilina e cumarina e de 0,15 e 0,50 mg/L para o siringaldeído, respectivamente.

A precisão do método analítico foi avaliada por meio dos testes de repetibilidade. Este representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição em um curto intervalo de tempo (Snyder, 1997 e Ribani et al., 2004). O estudo da precisão foi realizada por 3 injeções consecutivas de três soluções padrão na concentração de  $3 \times 10^{-6}$  mol/L,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L e  $8 \times 10^{-5}$  mol/L para cada analito. Os resultados foram submetidos a uma avaliação estatística e a precisão do método foi estabelecida como apresentada pelos dados descritos na Tabela 11. A precisão do método foi caracterizada pela porcentagem do desvio padrão relativo (RSD) variando de 0,27% (ácido siríngico) a 3,62% (ácido p-cumárico) na concentração de  $3 \times 10^{-6}$  mol/L, de 0,002% (catequina) a 3,30% (fenol) na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  mol/L e de 0,03% (ácido vanílico e umbeliferona) a 1,59% (ácido elágico) na concentração de  $8 \times 10^{-5}$  mol/L. Segundo Snyder et al. (1997), para análise de compostos presentes em baixas concentrações aceita-se que o valor de RSD não ultrapasse 5 ou 10% dependendo da complexidade da amostra, atestando assim, a precisão do método analítico proposto. Trabalhos similares como o de Aquino et al. (2006b) mostram valores de %RSD superiores ao encontrado neste trabalho para ácido gálico (7,01%), ácido vanílico (3,81%), ácido siríngico (4,36%), vanilina (4,27%), siringaldeído (2,84%) e cumarina (4,08%).

TABELA 11 - Médias das áreas dos picos para os compostos fenólicos obtidos de injeções consecutivas de três diferentes concentrações e os respectivos desvio padrão relativo (%RSD).

<b>Compostos</b>	<b>3x10<sup>-6</sup></b>	<b>RSD</b>	<b>1x10<sup>-5</sup></b>	<b>RSD</b>	<b>8x10<sup>-5</sup></b>	<b>RSD</b>
	<b>mol/L</b>	<b>(%)</b>	<b>mol/L</b>	<b>(%)</b>	<b>mol/L</b>	<b>(%)</b>
Ácido gálico	17837,23	1,25	66096,53	0,08	586116,17	0,08
Catequina	9090,3	1,25	30370,5	0,002	186091,2	0,07
Ácido vanílico	12944,57	0,31	42124,27	0,33	278089,7	0,03
Fenol	1868,67	1,26	6245,6	3,30	46139,5	0,46
Ácido siríngico	26845,83	0,27	90536,57	0,19	546251,27	0,08
Vanilina	27681,67	0,56	99332,87	0,17	576560,27	0,08
Siringaldeído	16737,6	0,87	59912	0,33	358647,13	0,05
Umbeliferona	55067,13	0,32	285532,87	0,09	1023811,4	0,03
Ácido p-cumárico	795	3,62	4457,77	2,67	20247,23	0,99
Ácido sinápico	26235,53	0,61	63340,83	1,37	303881,7	0,16
Ácido m-cumárico	62896,73	0,47	177711,77	0,21	1036733,67	0,08
Cumarina	32225,53	0,33	115680,1	0,41	690988,9	0,04
4metilumbeliferona	13959,1	0,32	45879,03	0,45	288822,63	0,05
Ácido o-cumárico	44442,17	0,36	141698,77	0,09	874509,6	0,29
Ácido elágico	14426,23	0,94	55715,43	0,54	387297,67	1,59
Eugenol	10528,73	2,63	28031,3	0,45	162382,13	0,33

A recuperação do método também foi avaliada nas amostras. A concentração dos compostos fenólicos foi calculada pelo aumento na área dos picos, obtida após adição de uma quantidade conhecida do padrão a uma das amostras e a porcentagem de recuperação calculada de acordo com a Eq. (5). Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração medida}}{\text{concentração esperada}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

TABELA 12 – Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de aguardente de cana.

Composto	Concentração (mg/L)			Recuperação (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado	
Ácido gálico	0,27	1,70	1,93	97,97 ± 0,25
Catequina	1,51	2,90	4,09	92,74 ± 0,11
Ácido vanílico	3,35	1,68	4,56	90,66 ± 0,04
Fenol	0,34	0,94	1,19	92,97 ± 0,24
Ácido siríngico	0,04	1,98	2,00	99,01 ± 0,12
Vanilina	0,26	1,52	1,73	97,20 ± 0,11
Siringaldeído	0,06	1,82	1,87	99,47 ± 0,25
Umbeliferona	0,12	1,62	1,78	102,30 ± 0,08
Ácido p-cumárico	1,65	1,64	3,12	94,83 ± 0,24
Ácido sinápico	1,20	2,24	3,31	96,22 ± 0,51
Ácido m-cumárico	ND	1,64	1,68	102,44 ± 0,28
Cumarina	11,27	1,46	12,32	96,78 ± 0,04
4-metilumbeliferona	2,33	1,76	3,75	91,69 ± 0,09
Ácido o-cumárico	0,11	1,64	1,66	94,86 ± 0,12
Ácido elágico	0,88	3,02	3,77	96,67 ± 0,13
Eugenol	11,37	1,64	14,90	114,53 ± 2,16

Pela análise dos dados da Tabela 12, pode-se observar que o intervalo da porcentagem de recuperação foi de 90,66 a 114,53 para os dezesseis compostos analisados. Baseando nos trabalhos de Ribani et al. (2004), esses resultados obtidos são satisfatórios, uma vez que os intervalos aceitáveis estão entre 70 e 120% para resíduos, com precisão de até ± 20% ou dependendo da complexidade analítica e da amostra de 50 a 120%, com precisão de ± 15%. De acordo com a literatura, valores de recuperação similares foram encontrados por

Aquino et al. (2006) na validação do método para análise de ácido gálico, 5-hidróximetilfurfural, furfural, ácido vanílico, ácido siringico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e cumarina em aguardentes de cana.

#### **4.3.3 Quantificação dos compostos fenólicos em aguardentes de cana por Cromatografia líquida de alta eficiência**

A Tabela 13 apresenta os teores de compostos fenólicos nas amostras analisadas. Baseando-se nos valores obtidos para cada composto e comparando-os entre as amostras, pode-se observar diferenças estatísticas significativas.

De acordo com Miranda et al. (2006), diversos fatores podem influenciar na qualidade da aguardente de cana envelhecida, como espécie da madeira, tamanho e pré-tratamento do barril, condições ambientais, tempo de envelhecimento e teor de álcool da bebida. Nas amostras analisadas as variáveis conhecidas foram a espécie da madeira, teor alcoólico, tempo de envelhecimento e tamanho do barril.

Quanto às espécies de madeira analisadas, pode-se observar a predominância de diferentes compostos fenólicos. Nas bebidas envelhecidas em barris de castanheira, tem-se a predominância dos ácidos gálico (12,14 mg/L) e elágico (10,70 mg/L) (L2); na amburana, cumarina (11,10 mg/L) e eugenol (6,69 mg/L) (L6); no louro canela, catequina (1,27 mg/L) e ácido vanílico (0,68 mg/L) (L8) e no jatobá somente foi encontrado a cumarina (0,08 mg/L) (L11). Avaliou-se também a predominância desses compostos em três barris de carvalho, três de jequitibá e dois de bálsamo. Foram encontrados para os barris de carvalho teores de siringaldeído (0,95 mg/L) e ácido elágico (2,08 mg/L) (L3), ácidos p-cumárico (9,32 mg/L) e elágico (10,50 mg/L) (L9), ácidos p-cumárico (1,39 mg/L) e elágico (1,52 mg/L) (L12); para os barris de jequitibá, ácidos gálico (1,62 mg/L) e elágico (1,82 mg/L) (L1), ácidos gálico (1,28 mg/L) e elágico (1,61 mg/L) (L4), ácido gálico (3,05 mg/L) e ácido elágico (2,10

mg/L) (L5) e para os barris de bálsamo ácido siríngico (3,77 mg/L) e eugenol (18,38 mg/L) (L7) e ácidos siríngico (0,40 mg/L) e elágico (0,42 mg/L) (L10), conforme apresentado nas Figuras 35, 36 e 37. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Dias et al. (2002), em que foram encontradas diferenças quanto à presença e concentração dos compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em espécies de madeira diferentes. Neste trabalho, os autores observaram a predominância de compostos como ácidos elágico e vanílico no carvalho; ácido vanílico e sinapaldeído em amburana; vanilina e ácido elágico no bálsamo; ácido gálico no jequitibá; coniferaldeído no jatobá e ácido siríngico e coniferaldeído no ipê.

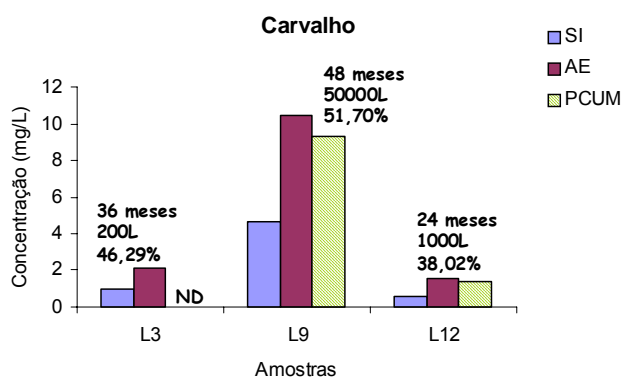


FIGURA 35 – Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de carvalho.

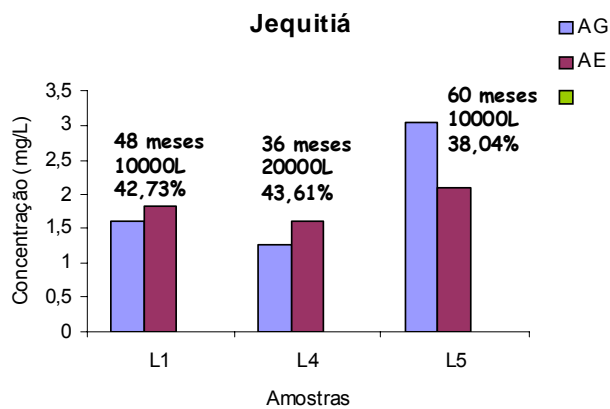


FIGURA 36 – Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de jequitibá.

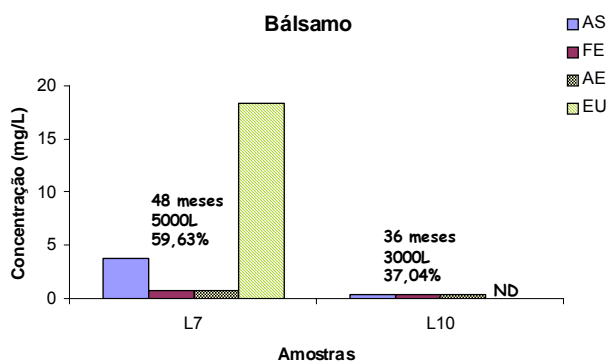


FIGURA 37 – Histograma dos teores dos compostos fenólicos predominantes nas aguardentes de cana envelhecidas em barris de balsamo.

TABELA 13 – Concentração (mg/L) de compostos fenólicos nas amostras de aguardente de cana analisadas.

Amostras Compostos	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
Ácido gálico	1.62 ± 7,12x10 <sup>-4</sup> a6	12.14 ± 2,94x10 <sup>-3</sup> a9	0.70 ± 3,76x10 <sup>-2</sup> a3	1.28 ± 7,13x10 <sup>-3</sup> a5	3.05 ± 6,27x10 <sup>-4</sup> a8	<LQ	<LQ	ND	2.80 ± 5,96x10 <sup>-3</sup> a7	ND	ND	1.05 ± 3,22x10 <sup>-3</sup> a4
Catequina	0.40 ± 2,27x10 <sup>-3</sup> a5	1.35 ± 1,44x10 <sup>-2</sup> a8	0.23 ± 2,00x10 <sup>-3</sup> a2	0.29 ± 4,98x10 <sup>-3</sup> a3	0.38 ± 5,59x10 <sup>-3</sup> a5	1.45 ± 1,38x10 <sup>-2</sup> a9	0.36 ± 7,07x10 <sup>-3</sup> a4	1.27 ± 5,00x10 <sup>-2</sup> a7	0.63 ± 1,65x10 <sup>-2</sup> a6	0.39 ± 1,30x10 <sup>-2</sup> a5	ND	ND
Ácido vanílico	0.69 ± 6,07x10 <sup>-3</sup> a4	0.54 ± 9,18x10 <sup>-3</sup> a3	0.29 ± 1,30x10 <sup>-2</sup> a2	0.17 ± 3,37x10 <sup>-3</sup> a1	0.29 ± 7,43x10 <sup>-3</sup> a2	3.30 ± 7,59x10 <sup>-4</sup> a6	0.60 ± 7,11x10 <sup>-3</sup> a3	0.68 ± 3,06x10 <sup>-3</sup> a4	1.37 ± 2,87x10 <sup>-3</sup> a5	<LQ	<LD	0.11 ± 4,03x10 <sup>-3</sup> a1
Fenol	0.39 ± 1,38x10 <sup>-2</sup> a3	0.62 ± 4,35x10 <sup>-3</sup> a4	0.73 ± 1,51x10 <sup>-1</sup> a4	0.35 ± 2,50x10 <sup>-3</sup> a3	1.01 ± 2,50x10 <sup>-2</sup> a5	0.35 ± 3,75x10 <sup>-3</sup> a3	0.75 ± 4,92x10 <sup>-2</sup> a4	<LQ	1.73 ± 1,26x10 <sup>-2</sup> a6	0.42 ± 1,09x10 <sup>-2</sup> a3	ND	0.68 ± 6,58x10 <sup>-4</sup> a4
Ácido siríngico	<LQ	0.13 ± 1,19x10 <sup>-3</sup> a5	0.48 ± 6,16x10 <sup>-3</sup> a9	<LQ	0.15 ± 3,01x10 <sup>-3</sup> a6	<LQ	3.77 ± 2,14x10 <sup>-3</sup> a11	0.10 ± 1,55x10 <sup>-2</sup> a4	1.59 ± 1,51x10 <sup>-3</sup> a10	0.40 ± 3,73x10 <sup>-3</sup> a8	ND	0.26 ± 6,12x10 <sup>-3</sup> a7
Vanilina	0.13 ± 1,70x10 <sup>-3</sup> a2	0.18 ± 2,56x10 <sup>-3</sup> a3	0.28 ± 1,72x10 <sup>-2</sup> a4	0.11 ± 1,53x10 <sup>-3</sup> a2	0.20 ± 1,15x10 <sup>-3</sup> a3	0.24 ± 2,92x10 <sup>-3</sup> a3	0.42 ± 3,11x10 <sup>-3</sup> a5	0.17 ± 1,75x10 <sup>-3</sup> a3	1.95 ± 2,66x10 <sup>-3</sup> a6	0.19 ± 6,86x10 <sup>-3</sup> a3	<LQ	0.20 ± 1,71x10 <sup>-3</sup> a3
Siringaldeído	0.67 ± 7,64x10 <sup>-3</sup> a7	1.50 ± 1,39x10 <sup>-3</sup> a9	0.96 ± 1,21x10 <sup>-2</sup> a8	0.34 ± 2,10x10 <sup>-3</sup> a5	0.98 ± 3,54x10 <sup>-3</sup> a8	<LQ	<LQ	0.08 ± 4,53x10 <sup>-3</sup> a4	4.65 ± 4,62x10 <sup>-3</sup> a10	<LD	ND	0.53 ± 5,32x10 <sup>-4</sup> a6
Umbeliferona	<LD	<LD	ND	ND	<LD	0.08 ± 1,77x10 <sup>-2</sup> a4	<LD	0.06 ± 1,09x10 <sup>-2</sup> a3	ND	ND	ND	ND

< LQ = menor que o limite de quantificação; < LD = menor que o limite de detecção; ND = não detectado.

...continua...



TABELA 13 – Cont.

<b>Amostras</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>	<b>L7</b>	<b>L8</b>	<b>L9</b>	<b>L10</b>	<b>L11</b>	<b>L12</b>
<b>Compostos</b>												
Ácido p-cumárico	1.28 ± 6,49x10 <sup>-3</sup> a2	1.50 ± 2,11x10 <sup>-2</sup> a2	ND	1.26 ± 1.06x10 <sup>-2</sup> a2	1.29 ± 4,23x10 <sup>-3</sup> a2	1.34 ± 1,35x10 <sup>-2</sup> a2	ND	ND	9.32 ± 5,11x10 <sup>-2</sup> a3	ND	ND	1.39 ± 3,78x10 <sup>-2</sup> a2
Ácido sinápico	ND	ND	ND	ND	ND	1.26 ± 9,23x10 <sup>-3</sup> a3	0.46 ± 7,07x10 <sup>-5</sup> a2	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido m-cumárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.48 ± 6,91x10 <sup>-2</sup> a3	ND	0.36 ± 6,84x10 <sup>-4</sup> a2	ND	ND	ND
Cumarina	0.77 ± 1,47x10 <sup>-3</sup> a6	0.11 ± 1,80x10 <sup>-3</sup> a3	0.14 ± 4,50x10 <sup>-4</sup> a4	0.20 ± 6,56x10 <sup>-4</sup> a5	0.09 ± 1,06x10 <sup>-3</sup> a2	11.10 ± 9,26x10 <sup>-4</sup> a7	0.19 ± 1,13x10 <sup>-2</sup> a5	ND	0.20 ± 1,65x10 <sup>-4</sup> a5	0.09 ± 4,98x10 <sup>-4</sup> a2	0.08 ± 1,27x10 <sup>-3</sup> a2	ND
4metilumbeliferona	0.53 ± 9,24x10 <sup>-3</sup> a3	0.41 ± 2,05x10 <sup>-2</sup> a2	ND	ND	ND	2.34 ± 4,38x10 <sup>-4</sup> a4	<LQ	0.54 ± 4,77x10 <sup>-2</sup> a3	<LQ	<LQ	ND	ND
Ácido o-cumárico	<LD	<LD	ND	ND	<LQ	<LQ	0.15 ± 4,68x10 <sup>-3</sup> a4	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido elágico	1.82 ± 0,02 a6	10.70 ± 1,03x10 <sup>-1</sup> a9	2.08 ± 5,68x10 <sup>-2</sup> a7	1.61 ± 2,64x10 <sup>-2</sup> a5	2.10 ± 5,98x10 <sup>-3</sup> a7	0.84 ± 4,73x10 <sup>-2</sup> a4	0.64 ± 1,99x10 <sup>-2</sup> a3	ND	10.50 ± 3,18x10 <sup>-1</sup> a8	0.42 ± 1,15x10 <sup>-3</sup> a2	ND	1.52 ± 6,74x10 <sup>-3</sup> a5
Eugenol	ND	<LD	ND	ND	ND	6.69 ± 1,01x10 <sup>-1</sup> a4	18.38 ± 8,40x10 <sup>-1</sup> a5	<LQ	5.80 ± 3,59x10 <sup>-1</sup> a3	ND	ND	ND

<LQ = menor que o limite de quantificação; <LD = menor que o limite de detecção; ND = não detectado.

Observando os dados descritos na Tabela 2 nota-se que as amostras provenientes das mesmas espécies de madeira diferem quanto à capacidade do barril e o tempo de armazenamento. Essas variáveis podem explicar as diferenças observadas em relação aos teores e presença de compostos fenólicos. Diferenças nos teores e na presença de ácidos (gálico e benzóico) e derivados do aldeído cinâmico também foram observados por Madrera et al. (2003) em conhaques quanto ao tempo de envelhecimento da bebida. Posteriormente, Aguiar (2004), analisando aguardentes de cana envelhecidas em tonéis de carvalho durante oito anos, mostrou que além do cheiro característico da madeira, ocorreu uma intensificação na cor com o aumento dos anos de envelhecimento.

Segundo dados da literatura, o teor de compostos extraídos da madeira aumenta com o tempo de envelhecimento e com o aumento da superfície de contato entre bebida/madeira (Miranda et al., 2006). Isso pode ser observado nas amostras L1, L4 e L5 provenientes de barris de jequitibá. No entanto, quando se observam as amostras L3, L9 e L12 (carvalho) e L7 e L10 (bálsamo), esse conceito não se aplica. As diferenças observadas entre os teores dos compostos que são comuns entre as amostras podem estar relacionadas ao teor alcoólico da bebida. Embora os barris apresentem maior capacidade, diminuindo a superfície de contato, o teor alcoólico da bebida é bem superior, promovendo uma extração mais efetiva dos compostos da madeira.

Outro fator relevante é o tempo de uso dos barris. Segundo Mori et al. (2006), a relação é inversamente proporcional entre o teor de compostos fenólicos presente na bebida e o tempo de uso dos barris de madeira no processo de envelhecimento.

Como a madeira é um material de estrutura complexa formada por materiais de parede celular (celulose, polioses e lignina) e por extrativos (compostos fenólicos, esteróides, terpenos, etc), a distribuição dos compostos

ocorre de forma variada e dependente da idade do vegetal (Klock et al., 2005). Portanto, além dos fatores citados acima, a presença de compostos fenólicos na bebida pode se relacionar com a posição da madeira (próximo da casca, medula, topo ou base) utilizada na confecção dos barris, assim como, a idade da árvore para obtenção da madeira.

Outro fator importante é a morfologia da célula, cujas características variam de espécie para espécie. Essa morfologia engloba tamanho de fibra, distribuição de vasos e espessura de parede celular. Dependendo da espécie, esses vasos podem estar obstruídos, impedindo a penetração da bebida e conseqüentemente o contato dessa com os extrativos e com as substâncias da parede celular, diminuindo a incorporação dos compostos à bebida.

Com exceção da amostra envelhecida em barris de jatobá, todas as outras apresentaram certa heterogeneidade quanto à presença dos compostos fenólicos, diferindo apenas quanto ao teor desses. Sabe-se que esses compostos, oriundos da degradação da lignina ou dos extrativos presentes no cerne da madeira, associados aos açúcares provenientes da degradação da hemicelulose e dos produtos provenientes das reações desencadeadas com o processo de envelhecimento, são os responsáveis pelo sabor e aroma característicos da bebida envelhecida, diferenciando-a da bebida denominada nova.

#### **4.3.4 Análise de cumarinas**

As cumarinas são uma classe de compostos presentes em bebidas envelhecidas. Dentre essas, as substâncias mais comuns quantificadas em bebidas e em alimentos são a 1,2-benzopirona (cumarina), umbeliferona, 4-metilumbeliferona e a escopoletina (Puech & Moutounet, 1988, Izquierdo et al., 2000, Aquino et al., 2006b, Jager et al., 2007, Jager et al., 2008 e Raters & Matissek, 2008). No entanto, essas são encontradas geralmente em baixas concentrações, o que dificulta sua análise por HPLC com detector de UV.

Empregando-se a extração em fase sólida, como tratamento prévio à análise de cumarinas, utilizou-se um cartucho C18 (fase reversa) (Figura 38), cujo processo de separação foi feito por partição. Nesse tipo de separação, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel e a interação ocorre de acordo com a polaridade do analito. Quanto mais apolar a molécula, maior será a interação com a fase estacionária e mais retida ficará a substância (Skoog et al., 2002 e Lanças, 2004).

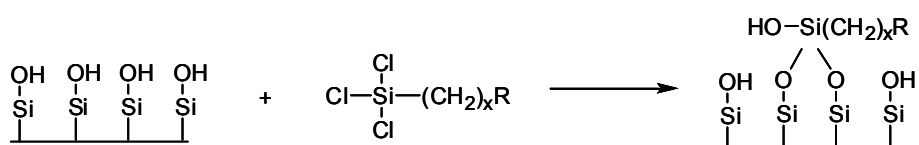


FIGURA 38 – Reação de preparação da fase estacionária de fase reversa, onde R = C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>, etc.

De acordo com os resultados obtidos apresentados na Tabela 14, pode-se observar que as concentrações de cumarina, umbeliferona e 4-metilumbeliferona diferiram estatisticamente, quando se compararam as amostras sem tratamento prévio e as amostras eluídas do cartucho de SPE. Na análise da cumarina (1,2-benzopirona), constatou-se que a técnica de SPE concentrou o analito, diminuindo as possíveis interferências entre esse composto e outros presentes na bebida, melhorando a detecção, com exceção das amostras L5, L9 e L10. Em relação a umbeliferona e a 4-metilumbeliferona, observou-se uma diminuição na concentração do analito em todas as amostras analisadas após tratamento com SPE, com exceção da amostra L9 para a umbeliferona.

TABELA 14 – Análise de cumarinas em aguardentes de cana envelhecidas em amostras sem tratamento prévio e em amostras tratadas por SPE.

Amostra	Cumarina (mg L <sup>-1</sup> )		Umbeliferona (mg L <sup>-1</sup> )		4metilumbeliferona (mg L <sup>-1</sup> )	
	S/T	C/T	S/T	C/T	S/T	C/T
L1	0.77 ± 1,47x10 <sup>-3</sup> a2	1.19 ± 1,46X10 <sup>-3</sup> a3	<LD	<LD	0.53 ± 9,24x10 <sup>-3</sup> a1	0.48 ± 6,22X10 <sup>-4</sup> a1
L2	0.11 ± 1,80x10 <sup>-3</sup> a1	0.14 ± 9,60X10 <sup>-3</sup> a2	<LD	<LD	0.41 ± 2,05x10 <sup>-2</sup> a2	ND
L3	0.14 ± 4,50x10 <sup>-4</sup> a1	0.13 ± 6,13X10 <sup>-3</sup> a1	ND	ND	ND	ND
L4	0.20 ± 6,56x10 <sup>-4</sup> a2	0.22 ± 1,71X10 <sup>-3</sup> a3	ND	ND	ND	ND
L5	0.09 ± 1,06x10 <sup>-3</sup> a2	ND	< LD	<LD	ND	ND
L6	11.10 ± 9,26x10 <sup>-4</sup> a2	14.05 ± 5,14X10 <sup>-3</sup> a3	0.08 ± 1,77x10 <sup>-2</sup> a2	<LQ	2.34 ± 4,38x10 <sup>-4</sup> a2	2.02 ± 1,10X10 <sup>-2</sup> a1
L7	0.19 ± 1,13x10 <sup>-2</sup> a1	0.23 ± 2,50X10 <sup>-2</sup> a2	< LD	ND	<LQ	<LQ
L8	ND	ND	0.06 ± 1,09x10 <sup>-2</sup> a2	<LD	0.54 ± 4,77x10 <sup>-2</sup> a2	ND
L9	0.20 ± 1,65x10 <sup>-4</sup> a2	0.13 ± 2,39X10 <sup>-3</sup> a1	ND	0.07 ± 8,56X10 <sup>-3</sup> a2	<LQ	ND
L10	0.09 ± 4,98x10 <sup>-4</sup> a2	ND	ND	ND	<LQ	ND
L11	0.08 ± 1,27x10 <sup>-3</sup> a2	0.09 ± 5,20X10 <sup>-4</sup> a2	ND	ND	ND	ND
L12	ND	ND	ND	ND	ND	ND

S/T = amostra sem tratamento; C/T = amostra eluída do cartucho de SPE; < LQ = menor que o limite de quantificação;  
< LD = menor que o limite de detecção; ND = não detectado.

Embora esses compostos pertençam a mesma classe, sua composição química varia em função da presença de grupos hidroxilas e/ou metila na molécula (Figura 39).

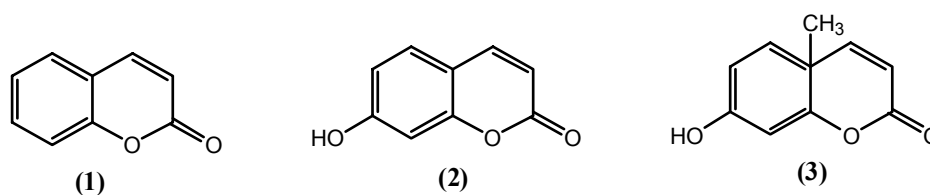


FIGURA 39 – Estrutura química da (1) cumarina, (2) umbeliferona e (3) 4-metilumbeliferona.

Essas substâncias apresentam uma certa polaridade que lhes é conferida pela presença das hidroxilas e dos grupos carboxílicos. Dentre essas três moléculas, pode-se inferir que a cumarina é a mais polar, pois a presença dos grupos hidroxila e carboxila nas extremidades opostas das moléculas de umbeliferona e 4-metilumbeliferona provocam um cancelamento do momento de dipolo, conferindo a essas um caráter mais apolar (Atkins & Loretta, 2006). Com isso, pode-se explicar o fato de as concentrações da umbeliferona e 4-metilumbeliferona terem diminuído, enquanto o inverso foi observado para a cumarina. Como a fase estacionária utilizada foi uma C18 de caráter apolar, essa teve maior afinidade pelas moléculas apolares, ficando assim, mais retidas. Por outro lado, como a característica da separação em fase reversa é a polaridade maior da fase móvel em relação à fase estacionária, observou-se uma maior afinidade da cumarina pelo eluente utilizado (metanol), aumentando assim a sua concentração.

Como a aguardente de cana é considerada uma matriz complexa, o comportamento diferente observado para algumas amostras em relação à análise de cumarinas e umbeliferona pode ser atribuída a possíveis interações entre o composto em estudo e outros presentes na bebida. Essas interações podem estar alterando a polaridade da molécula e, conseqüentemente, sua afinidade com a fase estacionária e/ou fase móvel.

## 5 CONCLUSÕES

Certificou-se um método analítico para determinação simultânea de compostos fenólicos (ácidos gálico, vanílico, siríngico, sinápico, elágico, orto, para e meta-cumárico, vanilina, siringaldeído, eugenol, fenol, catequina, cumarina, umbeliferona e 4-metilumbeliferona) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar.

Físico-quimicamente, 25% das amostras analisadas apresentaram-se fora dos padrões de qualidade exigidos quanto ao teor alcoólico, 16,67% quanto ao teor de ácidos voláteis e cobre e 83,33% quanto à presença de furfural. Todas as amostras apresentaram concentração abaixo do estabelecido pela Legislação (150,00 µg/L) para o carbamato de etila e, para a acroleína, apenas uma amostra apresentou níveis superiores a 5,00 mg/100 mL de álcool anidro.

Com exceção da aguardente de cana envelhecida em barris de jatobá, todas as outras apresentaram certa heterogeneidade quanto à presença dos compostos fenólicos, diferindo apenas quanto ao teor deles.

A utilização da extração em fase sólida (SPE), como tratamento prévio para a quantificação de cumarina (1,2-benzopirona), umbeliferona e 4-metilumbeliferona por HPLC, comparada à análise das amostras sem tratamento, mostraram-se estatisticamente diferentes, observando um aumento da detecção de cumarina após a aplicação da técnica e diminuição na detecção para umbeliferona e 4-metilumbeliferona.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P.M. **Aspectos físico-químicos de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho**. 2004. 47p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ALMEIDA, M.E.W.; BARRETO, H.H.C. Álcoois superiores em aguardentes de cana por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v. 31, p. 117-124, 1971.

ANDRADE, L.A.B. Cultura da cana-de-açúcar. In: \_\_\_\_\_. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 1-67.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1074-1077, 2002.

ANJOS, J.P.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; LIMA, A.J.B. Efeito de resina 2-pyrrolidinone, 1-ethenil-, homopolymer, usada nas cervejarias, sobre cachaça artesanal mineira. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2005, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas, MG: Sociedade Brasileira de Química, 2005.

APEX Brasil. **Agência de Promoção de Exportações e Investimentos**. Disponível em: <<http://www.apexbrasil.com.br/>>. Acesso em: 15 set. 2008.

AQUINO, F.W.B.; NASCIMENTO, R.F.; RODRIGUES, S.; CASEMIRO, A.R.S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, 2006a.

AQUINO, F.W.B.; RODRIGUES, S.; NASCIMENTO, R.F.; CASEMIRO, A.R.S. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006b.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2819–2824, 2001.

ATKINS, P.; LORETTA, J. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 968p.

AZEVÊDO, L.C.; REIS, M.M.; SILVA, L.A.; ANDRADE, J.B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, 2007.

BARCELOS, L.V.F.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; ANJOS, J.P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.

BETTIN, S.M.; FRANCO, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.

BOSCOLO, M. **Caramelo e carbamato de etila em aguardente de cana: ocorrência e quantificação**. 2002. 100p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP.

BRAGA, V.S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BRASIL. Decreto nº 55871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo. Brasília, 09 de abril de 1965.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 4851 de 02 de novembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 out. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1.

CAMPELO, E.A.P. Agronegócio da cachaça de alambique de Minas Gerais: panorama econômico e social. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 7-18, 2002.

CAMPOS, J.O.S.; AQUINO, F.W.B.; NASCIMENTO, R.F.; COSTA, J.G.M.; KEUKEKEIRE, D.; CASIMIRO, A.R.S. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, p. 179-185, 2004.

CANA Brasil. **Volume de cana em 2008/2009 supera safra anterior**. Disponível em: <<http://www.canabrasil.com.br/content/view/434/1/>>. Acesso em: 20 fev. 2009.

CANA Brasil. **Exportação de cachaça cresce 46% em 2008**. Disponível em: <<http://www.canabrasil.com.br/content/view/351/78/>>. Acesso em: 20 fev. 2009.

CANTÃO, F.O. **Análises físico-químicas e avaliação da presença do cobre em aguardentes de cana por aluminossilicatos**. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1241-1243, 2006.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 446p.

CARNACINI, A.; DI STEFANO, R.; RIPONI, C.; ANTONIELLI, A. Effect of wine making process on the volatile compounds of distillates. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.1, n. 4, 1989.

CAVALHEIRO, S.F.L.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; CARDELLO, H.M.A.B. Influência do Envelhecimento no teor de Cobre em Cachaças. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 99-108, 2003.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. São Paulo: E. Blücher, 1998. p. 28-41.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2007. 453p.

DIAS, S.M.B.C.; MAIA, A.B.R.A.; NELSON, D.L. Utilização de madeiras nativas no envelhecimento da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 46-51, 2002.

DIAS, S.M.B.C. O processo de destilação. In: \_\_\_\_\_. **Produção de Aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 138-202.

ESTANISLAU, M.L.L.; JÚNIOR, F.L.C.; PAIVA, B.M.. Mercado atual e potencial da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 19-24, 2002.

EVANGELISTA, A.R. Aproveitamento de resíduos da fabricação da cachaça. In: \_\_\_\_\_. **Produção de Aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 289-307.

FARIA, J.B.; POURCHET-CAMPOS, M.A. Eliminação do cobre contaminantes das aguardentes de cana (*Saccharum officinarum L.*). **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v.1, p. 117-126, 1989.

FARIA, J.B.; CARDELLO, H.M.A.B.; FRANCO, D.W.; BÔSCOLO, ISIQUE, W.D., ODELO, L., FRANCO, D.W. Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, New York, v. 218, n. 1, p. 83-87, 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Versão 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA: DEX, 2003. Software.

FURTADO, S.M.B. **Avaliação sensorial descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas**. 1995. 99p. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

GALHIANE, M.S. **Análise de aroma em bebidas por cromatografia gasosa de alta resolução**. 1989. 99p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

GOMES, F.C.O. **Estudo comparativo de duas linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* como iniciadoras da fermentação para a produção da cachaça artesanal**. 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 106-111, 2002.

GUYMON, J.F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A.D. (Ed.). **Chemistry of winimaking**, Washington, 1974. p. 232-253. (Advances in Chemistry, 137).

HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862p.

HAWTHORNE, S.B.; TREMBLEY, S.; MONIOT, C.B. Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environmental solids. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 886, p. 237-244, 2000.

International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

IZQUIERDO, F.M.E.; QUESADA, G.J.; VILLALÓN Mir M.; LÓPEZ, M.M.C. Factores que condicionan la presencia de cumarinas en bebidas alcohólicas envejecidas en barril de roble. **Alimentaria**, Madrid, v. 3, p. 127-35, 1996.

IZQUIERDO, F.M.E.; QUESADA, G.J.; VILLALÓN Mir M.; LÓPEZ, M.M.C. Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. **Food Chemistry**, London, v. 70, p. 251-258, 2000.

JAGER, L.S.; PERFETTI, G.A.; DIACHENKO, G.W. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1145, p. 83-88, 2007.

JAGER, L.S.; PERFETTI, G.A.; DIACHENKO, G.W. Comparation of headspace-SPME-GC-MS and LC-MS for the detection and quantification of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 1701-1709, 2008.

KLOCK, U.; MUNIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. **Química da madeira**. 3.ed. Curitiba: UFP. Setor de Ciências Agrárias. 2005. 86p.

LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardente de cana por CG-EM. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1860-1864, 2008.

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240p.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p.

LEÃO, M.M. **Influência do termotratamento na composição química da madeira de amburana (*Amburana cearensis*), bálsamo (*Myroxylon balsamun*) e carvalho (*Quercus sp.*) e o impacto no aroma de uma solução modelo de cachaça**. 2006. 85p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais. Tecnologia de Produtos Florestais)–Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LIMA, A.J.B.; CARDOSO, M.G.; GUERREIRO, M.C.; PIMENTEL, F.A. Emprego do carvão ativado para a remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 247-250, 2006.

LOCATELLI, M.; FILHO, E.P.S.; VIEIRA, A.H.; MARTINS, E.P.; PEQUENO, P.L.L. **Castanha-do-brasil** - opção para solo de baixa fertilidade na Amazônia. 2003. Disponível em:  
<<http://www.sobrade.com.br/eventos/2003/seminario/Trabalhos/017.pdf>>.  
Acesso em: 24 set. 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 2, p.352.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1, p.368.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MACKENZIE, W.M.; CLYNE, A.H.; MACDONALD, L.S. Ethyl carbamate formation in grain based spirits. Part II: The identification and determination of cyanide related species involved in ethyl carbamate formation in scotch grain whisky. **Journal Inst. Brew.**, London, v. 96, n. 4, p. 223-232, 1990.

MADRERA, R.R.; GOMIS, D.B.; ALONSO, J.J.M. Characterization of cider brandy on the basis of aging time. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 6, p. 1958-1961, 2003.

MAIA, A.B.R.A.; NELSON, D.L. Comparative study of soy and flours on the of alcoholic fermentation in successive batches. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 59, p. 171-179, 1994.

MAIA, A.B. **Segundo curso de tecnologia para produção de aguardente de qualidade**. Belo Horizonte: UFMG/Escola de Engenharia/Fundação Cristiano Ottoni, 1994. 65 p.

MAIA, A.B.R. Componentes voláteis da aguardente. **STAB**, Piracicaba, v. 12, n. 6, p. 29-34, 1999.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z, 2004.

MAIA, A.B.R.A.; CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: Sebrae/MG/Sindbebedas, 2006. 129p.

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

MASSON, G. MOUTOUNET, M.; PUECH, J.L. Ellagitanins content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 2, p. 262-268, 1995.

MASSON, J.; CARDOSO, M.G.; VILELA, F.J.; PIMENTEL, F.A.; MORAIS, A.R.; ANJOS, J.P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, 2007.

MIRANDA, M.B.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Estudo do Efeito da Irradiação Gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) na Qualidade da Cachaça e no Tonel de Envelhecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 772-778, 2006.

MORI, F.A.; MENDES, L.M.; TRUGILHO, P.F.; CARDOSO, M das G. Utilização de eucaliptos e de madeiras nativas no armazenamento de aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 396-400, 2003.

MORI, F.A.; MENDES, L.M.; SILVA, J.R.M.; TRUGILHO, P.F. Influência da qualidade da madeira no envelhecimento da aguardente. In: \_\_\_\_\_. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 243-270.

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

NASCIMENTO, R.F.; MARQUES, J.C.; LIMA NETO, B.S.; KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D.W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, n. 782, p. 13-23, 1997.

NASCIMENTO, R.F.; CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO B.S.; FRANCO D.W.; FARIA, J.B. Influência do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 735-739, 1998.

NOVAES, F.V. **Produção e qualidade da aguardente de cana**. Piracicaba: ESALQ, 1995. 27 p.

NOVAES, F.V. Em nome da qualidade da aguardente de cana. **O Engarrafador Moderno**, São Paulo, v. 7, n. 46, p. 68-73, 1997.

OLIVEIRA, E.S. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. 2001. 135f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

ONISHI M, GUYMON JF, CROWELL EA. Changes in some volatile constituents of brandy during aging. **American Journal Enologic Viticulture**, v. 28, p. 152–8, 1977.

OTSUKA, K.; ZENIBAYASHI, Y. On the determination of scopoletin in aged distillates liquors. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 38, p. 1079-1080, 1974.



PARAZZI, C.; ARTHUR, C.; LOPES, J.J.C.; BORGES, M.T.M.R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 104-108, 1998.

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; S AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.5, p.1068-1075, 2003.

PEREIRA NETTO, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

PIGOTT, J.R. (Ed.). **Distilled beverage flavour**. Weinheim: VCA, 1989.

PUECH, J.L.; MOUTOUNET, M. Liquid chromatographic determination of scopoletin in hydroalcoholic extracts of oak wood and in matured distilled alcoholic beverages. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, p. 512-514, 1988.

QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

QUEIROZ, L. **História da cachaça**. Disponível em:  
<<http://www.museudacachaca.com.br/>>. Acesso em: 24 set. 2008.

QUESADA, G.J.; VILLALÓN, M.M.; LÓPEZ, G.H.; LÓPEZ, M.M.C. Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies: aging markers. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 1378–1381, 1996.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, p. 637-642, 2008.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic, 1970.

SALAGOITY, M. H., TRICARD, C. ; SUDRAUD, P. Dosage simultane des aldehydes aromatiques et des coumarins par chromatographie liquide haute performance. Application aux vins et eaux-de-vie vieillies en futs de Chêne. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 392, p. 379-387, 1987.

SCHWAN, R.F.; CASTRO, H.A. Fermentação alcoólica. In: \_\_\_\_\_. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 45-57.

SCHWAN, R.F. Fermentação. In: \_\_\_\_\_. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 101-135.

SERRA, G.E.; PUPIN, A.M.; TOLEDO, M.C.F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Boletim de **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 134–137, 1995.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2001. 259p.

SHEREV, R.N.; BRINK, J. A. Indústria de fermentação. In: SHEREV, R. N. (Ed.). **Indústrias de processos químicos**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. Cap. 31, p. 469-495.

SILVA, C.L.C.; ROSA, C.A.; MAIA, A.B.R.A.; OLIVEIRA, E.S. Qualidade química e sensorial de cachaças produzidas com quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (floculantes, não-produtoras de H<sub>2</sub>S e de referência). **B. CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 405-422, 2006.

SIMÕES, C.M.; SHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 1102p.

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

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method development**. 2.ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 694-697.

SKOOG, D.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOARES, J.E.C.; VAN LEEUWEN, J.; GOMES, J.B.M. **O desenvolvimento da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em plantios agroflorestais no município de Manacapuru, Amazonas, Brasil**. 2004. Disponível em: <<http://www.inpa.gov.br/cpca/johannes/Emidio-Curitiba-2004.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2007.

SOUSA, M.V.F. **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* na produção de cachaça artesanal**. 2005. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, M.H. de; MAGLIANO, M.M.; CAMARGOS, J.A.A.; SOUZA, M.R. de. **Madeiras tropicais brasileiras = brazilian tropical woods**. 2.ed. Brasília: IBAMA, 2002. 152 p.

SOUZA, P.P.; SIEBALD, H.G.L.; AUGUSTI, D.V.; NETO, W.B.; AMORIM, V.M.; CATHARINO, R.R.; EBERLIN, M.N.; AUGUSTI, R. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of brazilian artisan cachaça aged in different wood casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2094-2102, 2007.

TFOUNI, A.V.S.; MACHADO, M.D.R.; CAMARGO, C.R.M.; VITORINO, H.P.S.; TOLEDO, F. C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaca by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 334-338, 2007.

TRINDADE, A.G. **Cachaça um amor brasileiro**. São Paulo: Melhoramentos, 2006.

URBAIN, W.M. **Food irradiation**. New York: Academic, 1986. 351p.

ZAMPERLINNI, C.M.G.; SILVA-SANTIAGO, M.; VILEGAS, W. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gás chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 889, p. 281-289, 2000.

WALDER, J.M.M.; SPOTO, M.H.F.; NOVAES, F.V.; ALCARDE, A.R. Aging of sugar cane spirit using gamma radiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 9., 2004, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier, 2004.

WINDHOLTZ, M. **The merck index**. Rahway: Merck, 1976.

YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 283p.

VILELA, F.J.; CARDOSO, M.G.; ANJOS, J.P.; MASSON, J. Otimização do uso de resina de troca iônica em aguardente com excesso de cobre. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 19., 2005, Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro Preto, MG: Sociedade Brasileira de Química, 2005. p. 146-146. CD ROM.

VILELA, F. J. ; CARDOSO, M. G. ; MASSON, J.; ANJOS, J. P. Determinação das concentrações físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e de suas misturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.4, p. 1089-1094, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO A – Reações envolvidas nas análises físico-químicas

	<b>Página</b>
FIGURA 1A Reações envolvidas na análise de álcoois superiores.....	116
FIGURA 2A Reações envolvidas na análise de aldeídos.....	117
FIGURA 3A Reações envolvidas na análise de furfural.....	117
FIGURA 4A Reações envolvidas na análise de ésteres.....	118
FIGURA 5A Reações envolvidas na análise de metanol.....	118
FIGURA 6A Reações envolvidas na análise de cobre.....	119

### 1. Álcoois superiores

A reação colorimétrica de álcoois superiores (Figura 1A) envolve a formação da substância colorida pela interação dos álcoois com o aldeído cíclico na presença de ácido sulfúrico concentrado. A curva analítica é construída utilizando-se uma solução de álcool isoamílico e as leituras efetuadas em espectrofotômetro a 540 nm.

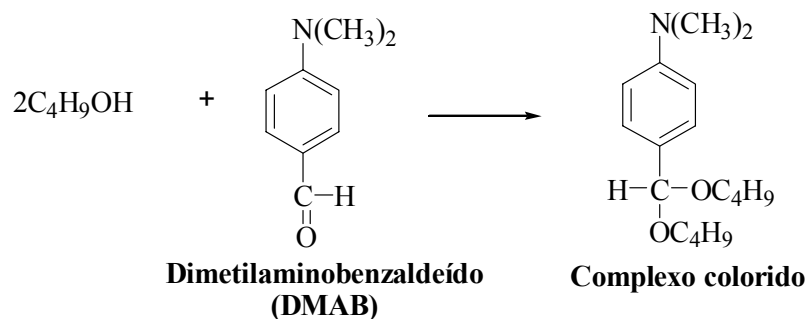


FIGURA 1A – Reações envolvidas na análise de álcoois superiores.

### 2. Aldeídos

O método baseia-se na reação de aldeídos com íons bissulfitos (em excesso) em meio tamponado a pH neutro. O bissulfito em excesso reage com iodo, em meio fortemente ácido (pH 2,0), para impedir a dissociação dos compostos aldeído-bissulfito, que é estável nesse pH. Finalmente, o bissulfito, que está combinado com o aldeído, é liberado em meio alcalino (pH 9,0), sendo titulado com a solução de iodo (Figura 2A).



O  $\text{SO}_2$  em excesso reage com  $\text{I}_2$  em meio ácido



Em meio alcalino, o aldeído é então determinado

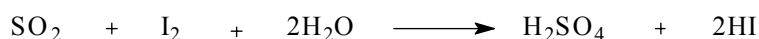


FIGURA 2A – Reações envolvidas na análise de aldeídos.

### 3.Furfural

A quantificação de furfural é feita por meio do método colorimétrico em amostras cujo grau alcoólico deve estar a 50%. O furfural reage com anilina em meio ácido, formando um composto colorido que é quantificado a 520 nm no espectrofotômetro, após a construção de uma curva analítica.

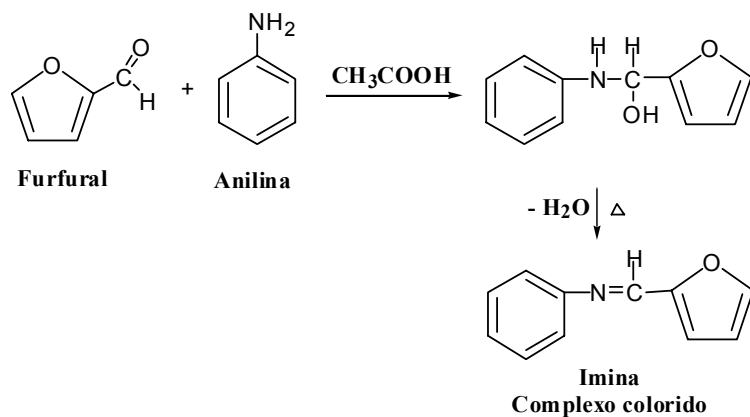


FIGURA 3A – Reações envolvidas na análise de furfural.

#### 4. Ésteres

A quantificação dos ésteres é feita a partir da hidrólise alcalina desses, presentes na aguardente, seguida da titulação dos ácidos liberados com solução padronizada de hidróxido de sódio (Figura 4A).

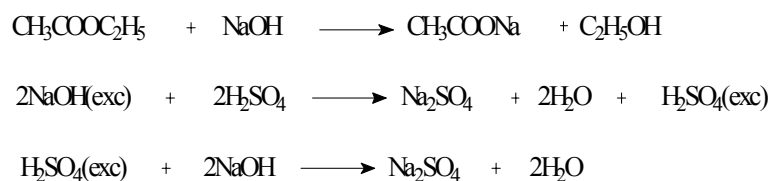


FIGURA 4A – Reações envolvidas na análise de ésteres.

#### 5. Metanol

A determinação do metanol em aguardentes baseia-se na sua oxidação a formaldeído, o qual reage com o ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico concentrado, formando um composto colorido (Figura 5A). A leitura é realizada em espectrofotômetro a 575 nm.

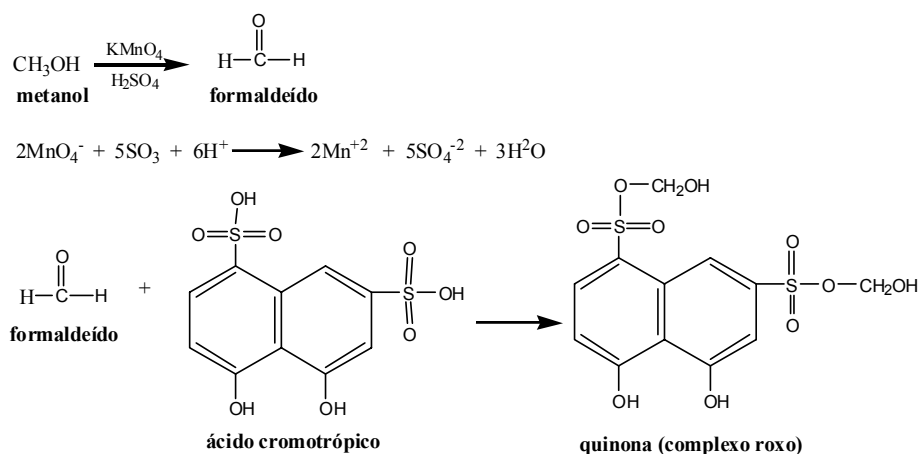


FIGURA 5A – Reações envolvidas na análise de metanol.



## 6.Cobre

A análise de cobre ocorre após redução do  $\text{Cu}^{2+}$  presente na bebida a  $\text{Cu}^{1+}$ , formando posteriormente um complexo colorido com a solução de 2,2 diquinolilo em álcool isoamílico (Figura 6A). As leituras são realizadas em espectrofotômetro a 546 nm.

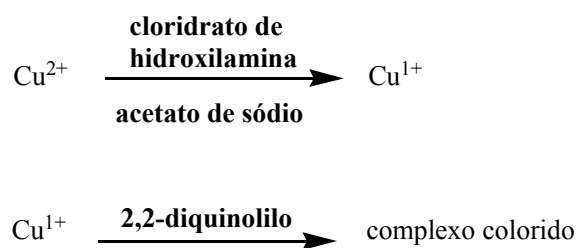


FIGURA 6A – Reações envolvidas na análise de cobre.

**ANEXO B – Caracterização do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína**

	<b>Página</b>
TABELA 1B	
Determinação da temperatura de fusão do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína (2,4-DNPH acroleína).....	121
TABELA 2B	
Análise química elementar do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína (2,4-DNPH acroleína).....	121

TABELA 1B Determinação da temperatura de fusão do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína (2,4-DNPH acroleína).

<b>Composto</b>	<b>T.F. observado (°C)</b>	<b>T.F. literatura (°C)</b>
<b>2,4-DNPH Acroleína</b>	164,4 ± 4	165

Média de duas repetições; Equipamento BUCHI 535.

TABELA 2B - Análise química elementar do derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína (2,4-DNPH acroleína).

<b>Composto</b>	<b>Elemento</b>	<b>Calculado</b>	<b>Encontrado</b>
2,4-DNPH	<b>Carbono (%)</b>	45,70	46,00
Acroleína	<b>Hidrogênio (%)</b>	3,40	3,50
	<b>Nitrogênio (%)</b>	23,70	22,70

Equipamento FLASH EA 1112 Séries CHNS-O ANALYSER – Thermo Eletronic Corporation.

## ANEXO C – Definições dos parâmetros cromatográficos

	<b>Página</b>
FIGURA 1C Relação existente entre os vários operacionais em cromatografia.....	123
FIGURA 2C Fator de assimetria de um pico cromatográfico.....	127

A Figura 1C ilustra o significado físico dos principais termos discutidos nesta seção.

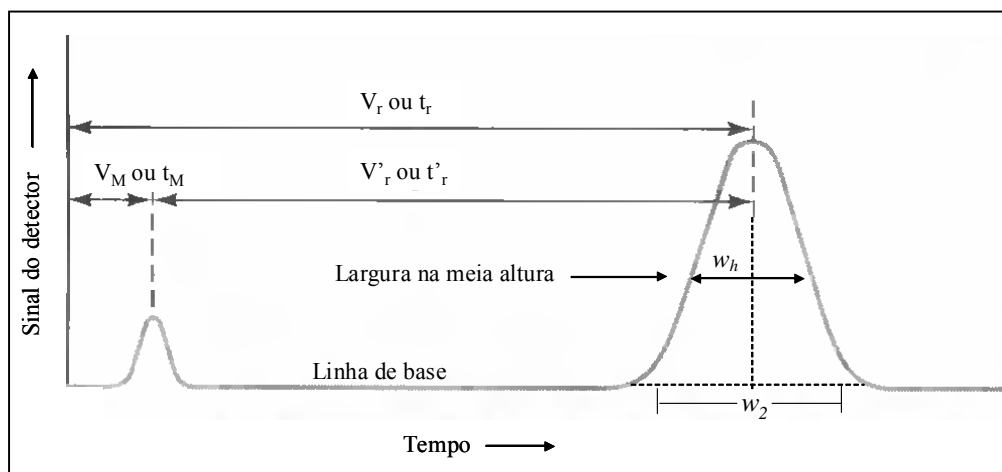


FIGURA 1C – Relação existente entre os vários operacionais em cromatografia.

### 1) Tempo de retenção ( $t_r$ )

O tempo de retenção é o tempo transcorrido desde a injeção da amostra até a eluição do ponto máximo do pico. Relaciona-se com o volume de retenção ( $V_r$ ) através do fluxo na coluna ( $F_c$ ), em que  $V_r$  é o volume necessário de fase móvel para eluir o soluto da coluna. O tempo de retenção engloba todo o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, seja na fase móvel, seja na fase estacionária (Ciola, 1998 e Harris, 2001).

$$t_r = \frac{V_r}{F_c}$$

### 2) Tempo de retenção ajustado ( $t'_r$ )

É o tempo de retenção menos o tempo morto, ou seja,  $t'_r = t_r - t_M$ . Ele mede o tempo que a amostra permanece na fase líquida.

### 3) Fluxo da coluna (Fc)

É o volume de fase móvel que passa pela coluna por unidade de tempo (geralmente é medido em mL/min).

### 4) Número de pratos teóricos ou eficiência (N)

A eficiência de uma coluna é, em geral, determinada pelo número de pratos teóricos,  $N$ , gerados. Quanto mais pratos teóricos, maior a eficiência e, portanto, melhor a separação. Um prato teórico é definido como sendo um equilíbrio de distribuição entre as duas fases: quanto maior o valor de  $N$ , mais equilíbrios existirá e a separação será maximizada. Na prática, o número de pratos teóricos para um dado componente é calculado a partir do próprio cromatograma obtido (Figura 1B), no qual  $t_r$  é o tempo de retenção e  $w_2$ , a largura da base do pico, obtida tangenciando-se a gaussiana até que intercepte a linha base. Neste caso, o número de pratos teóricos é dado por:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w_2} \right)^2$$

Nos casos em que o valor de  $w_2$  é difícil de ser obtido, principalmente para picos mal resolvidos, com severa variação na linha base, pode-se calcular  $N$  a partir da largura do pico na meia-altura,  $w_h$

$$N = 5,545 \left( \frac{t_r}{w_h} \right)^2$$

### 5) Altura equivalente a um prato teórico (H)

Segundo a equação de Van Demter, o valor equivalente a um prato teórico tem grande importância para avaliação da eficiência da coluna, mas também para avaliar a fase móvel empregada. Entende-se por  $H$  o comprimento

da coluna no qual o equilíbrio termodinâmico foi atingido entre a substância, a fase móvel e a fase estacionária. Esse valor é calculado dividindo-se o valor do comprimento da coluna pelo número de pratos calculados (Lanças, 1993 e Ciola, 1998).

$$H = \frac{L}{N}$$

em que: H = altura equivalente a um prato teórico (mm); L = comprimento da coluna (mm)

#### **6) Resolução (R)**

A resolução (R) é a medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a expressão (Skoog et al., 2002):

$$R = \frac{2t_{r1} - t_{r2}}{w_1 + w_2}$$

em que:  $t_{r2}$  e  $t_{r1}$  = tempo de retenção de picos adjacentes;  $w_1$  e  $w_2$  = largura dos picos na base em unidade de tempo.

Os valores de resolução acima de 1,5 significam que os analitos têm uma separação até a linha-base, fato importante em análises quantitativas, pois a medida exata da área depende da resolução total dos analitos envolvidos. Ainda, os valores inferiores a 1,5 significam que a separação somente é parcial e, portanto, a determinação da área dos picos do analito se torna inexata e a análise quantitativa errônea.

### 7) Fator de separação ( $\alpha$ )

O fator de separação é relacionado com a separação de dois picos adjacentes, sendo calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção  $k_2$  (analito mais retido) e  $k_1$  (analito menos retido), por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a expressão (Skoog et al., 2002 e Collins et al., 2007):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

O fator de separação é uma medida de seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, quanto mais seletivamente a fase estacionária retiver o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação. Se  $\alpha = 1$ , não há diferenças termodinâmicas entre os dois componentes em um dado sistema e eles podem ser separados. Entretanto, quando  $\alpha > 1$ , isso não significa que os picos estejam totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem parcialmente sobrepostos. Conseqüentemente, não somente com valores elevados de  $\alpha$  se consegue separação, é necessário também que os picos sejam estreitos.

### 8) Fator de retenção ( $k$ )

O fator de retenção ou fator de capacidade diz respeito à retenção do soluto, que é determinado pela razão entre os tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária e percorre a coluna na fase móvel, de acordo com a expressão (Skoog et al., 2002).

$$K = \frac{t_r - t_M}{t_M} = \frac{t'_r}{t_M}$$

em que:  $t'_r$  = tempo de retenção ajustado.



Os valores ideais de k devem variar de 0,5 a 20,0. Os valores de k menores que 0,5 implicam pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise (Harris, 2001).

### 9) Assimetria (A)

A assimetria ou fator de assimetria de um pico é dado por (Figura 2C):

$$A = \frac{a + b}{2a}$$

A assimetria é, muitas vezes, causada pelo aparecimento de caudas (tailing) nos picos, motivada por adsorção, a qual podem ocorrer na fase estacionária, injetor, tubos de conexão, etc. Quanto maior o valor determinado aproximar-se da unidade, maior a simetria do pico e melhor seu comportamento cromatográfico. O fator de assimetria é 10% da altura do pico. O valor deve ficar no intervalo de 1,0 a 1,5. Embora valores menos desejáveis de 1,5 são admitidos, como regra geral, colunas com fator de assimetria de 1,5 devem ser descartadas.

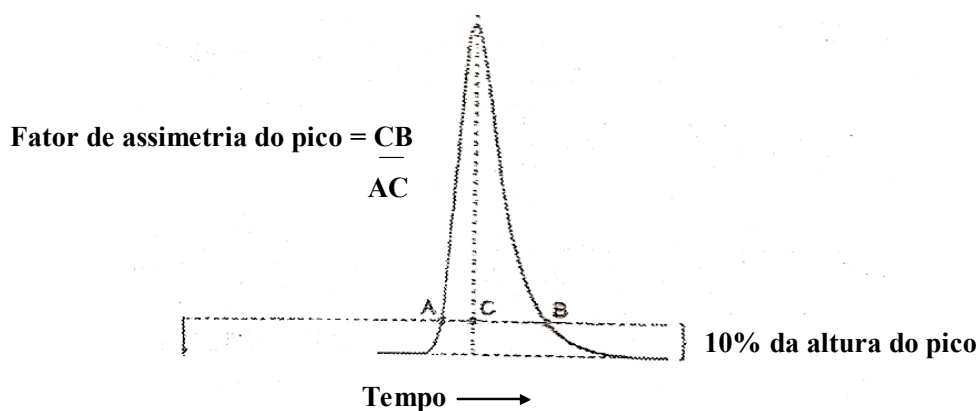


FIGURA 2C – Fator de assimetria de um pico cromatográfico (Skoog et al., 2002).

## **ANEXO D - Parâmetros analíticos para validação de métodos**

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

### **1) Seletividade**

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Esse parâmetro garante que o pico de resposta seja exatamente do composto de interesse. Pode ser avaliado comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com essa, por meio de análises que utilizam detectores modernos, comparados a de um padrão ou por meio do método de adição padrão (Snyder et al., 1997 e Ribani et al., 2004).

### **2) Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Esse parâmetro pode ser obtido por simples medidas de várias concentrações do analito. Os dados são então processados usando a equação de regressão linear e a inclinação, o intercepto e o coeficiente de correlação linear obtidos na curva analítica, nos dão informações sobre a linearidade do método. Uma outra forma de obter a linearidade envolve a determinação do fator de resposta (FR) para cada medida de concentração versus o log da concentração do analito. O fator de resposta (FR) é dado por:

$$FR = \frac{RD}{C}$$

em que: RD é a resposta do detector (área ou peso do pico) e C é a concentração do analito (Snyder et al., 1997 e Ribani et al., 2004).

### 3) Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a precisão é dividida dentro de três tipos: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade é a precisão do método sob as mesmas condições operacionais em um curto período de tempo. Um aspecto dessa é a precisão instrumental. Essa é medida por injeções repetitivas, seqüenciais da mesma amostra (10 ou mais vezes), seguida pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio-padrão relativo. Um segundo aspecto desse tipo de precisão, também conhecido como precisão intra-ensaio, envolve múltiplas medidas da mesma amostra (diferentes preparações) pelo mesmo analista sob as mesmas condições.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do mesmo laboratório devido a eventos como análises em diferentes dias, instrumentos ou analistas ou pela combinação destes fatores.

A reprodutibilidade é a precisão medida entre laboratórios e frequentemente é determinada em estudos colaborativos ou transferência de métodos experimentais.

A precisão de um método é geralmente expressa pelo desvio padrão (SD) ou pelo desvio padrão relativo (RSD) dos dados, utilizando-se as equações:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{RSD (\%)} = \frac{100 \text{ SD}}{x}$$

em que:  $x_i$  é a medida individual da amostra;  $x$  é a média das medidas e  $n$  é o número de medições realizadas.

#### 4) Exatidão

A exatidão de um método é definida como a concordância obtida entre o valor medido e o valor aceito como verdadeiro. O número de ensaios varia de acordo com a legislação ou diretriz adotada. A ICH estabelece um mínimo de nove determinações envolvendo pelo menos três diferentes concentrações. Geralmente, a exatidão é representada e determinada por estudos de recuperação, mas há três formas para determiná-la: por comparação com um padrão de referência, recuperação do analito e por adição padrão.

#### 5) Limite de detecção (LD)

Representa a menor concentração do analito que pode ser detectada. Esse parâmetro pode ser calculado pelo método visual, que consiste na adição de concentrações conhecidas do analito na matriz, distinguindo entre sinal e ruído na menor concentração detectável; pelo método da relação sinal-ruído, cuja a proporção deve ser de 3:1 e pelos parâmetros da curva analítica. Este último é obtido por meio da seguinte expressão:

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

em que  $s$  é a estimativa do desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

#### **6) Limite de quantificação (LQ)**

Pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser exatamente quantificada. Os métodos utilizados para sua determinação são os mesmos listados acima para a determinação do limite de detecção, porém, a relação sinal-ruído é de 10:1 e a expressão utilizada pelo método dos parâmetros da curva analítica é:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

#### **7) Robustez**

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH, 1995), robustez é definida como a capacidade de um método permanecer inalterado quando pequenas, mas deliberadas variações ocorrem em seus parâmetros. Pode ser avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros, como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel, programação de temperatura, bem como o tempo de extração, agitação, etc.

## ANEXO E – Cromatogramas

	<b>Página</b>
FIGURA 1E Cromatograma dos padrões utilizando-se acetonitrila como solvente da fase móvel (ACNP1).....	133
FIGURA 2E Cromatogramas dos padrões nas temperaturas de 30 e 35°C.....	133
FIGURA 3E Cromatogramas das amostras de aguardente de cana analisadas.....	134

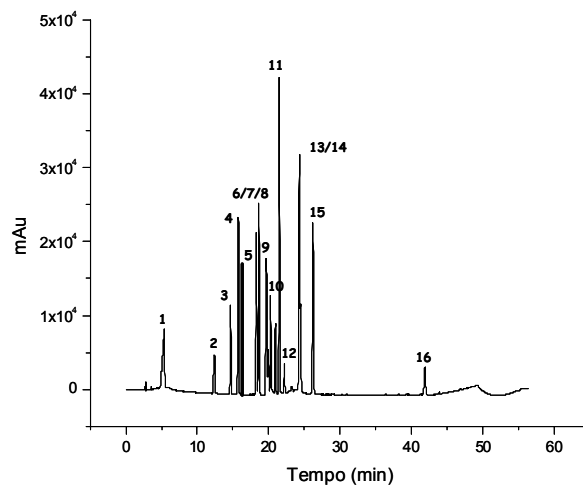


FIGURA 1E – Cromatograma dos padrões utilizando-se acetonitrila como solvente da fase móvel (ACNP1). Identificação dos picos: (1) ácido gálico, (2) catequina, (3) ácido vanílico, (4) fenol, (5) ácido siríngico, (6) vanilina, (7) siringaldeído, (8) umbeliferona, (9) ácido p-cumárico, (10) ácido sinápico, (11) ácido m-cumárico, (12) cumarina, (13) 4-metil-umbeliferona, (14) ácido o-cumárico, (15) ácido elágico, (16) eugenol.

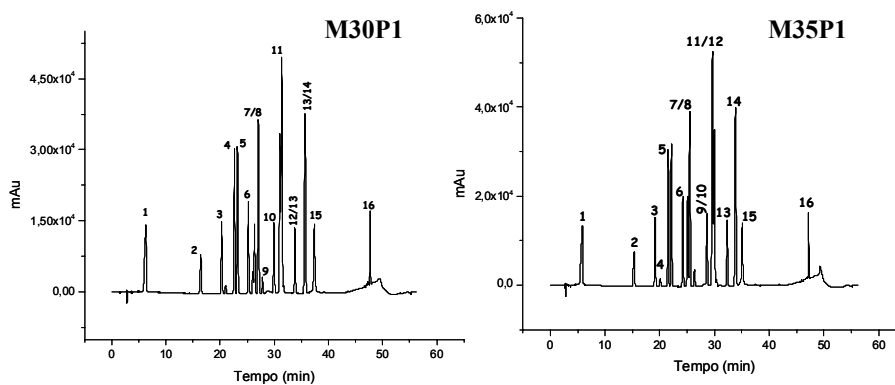


FIGURA 2E – Cromatogramas dos padrões nas temperaturas de 30 e 35°C. Identificação dos picos idem Figura 1E.

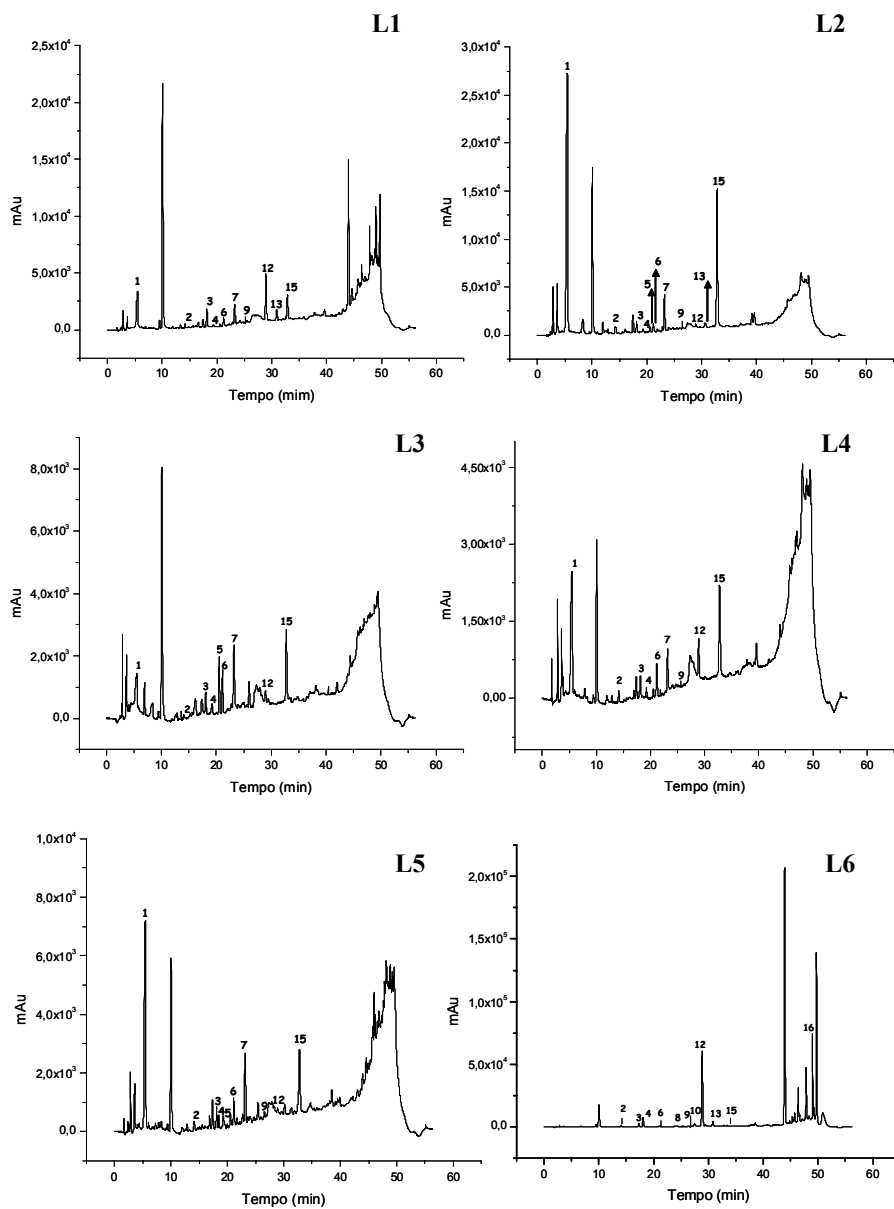


FIGURA 3E – Cromatogramas das amostras de aguardente de cana analisadas. Identificação dos picos idem Figura 1E.



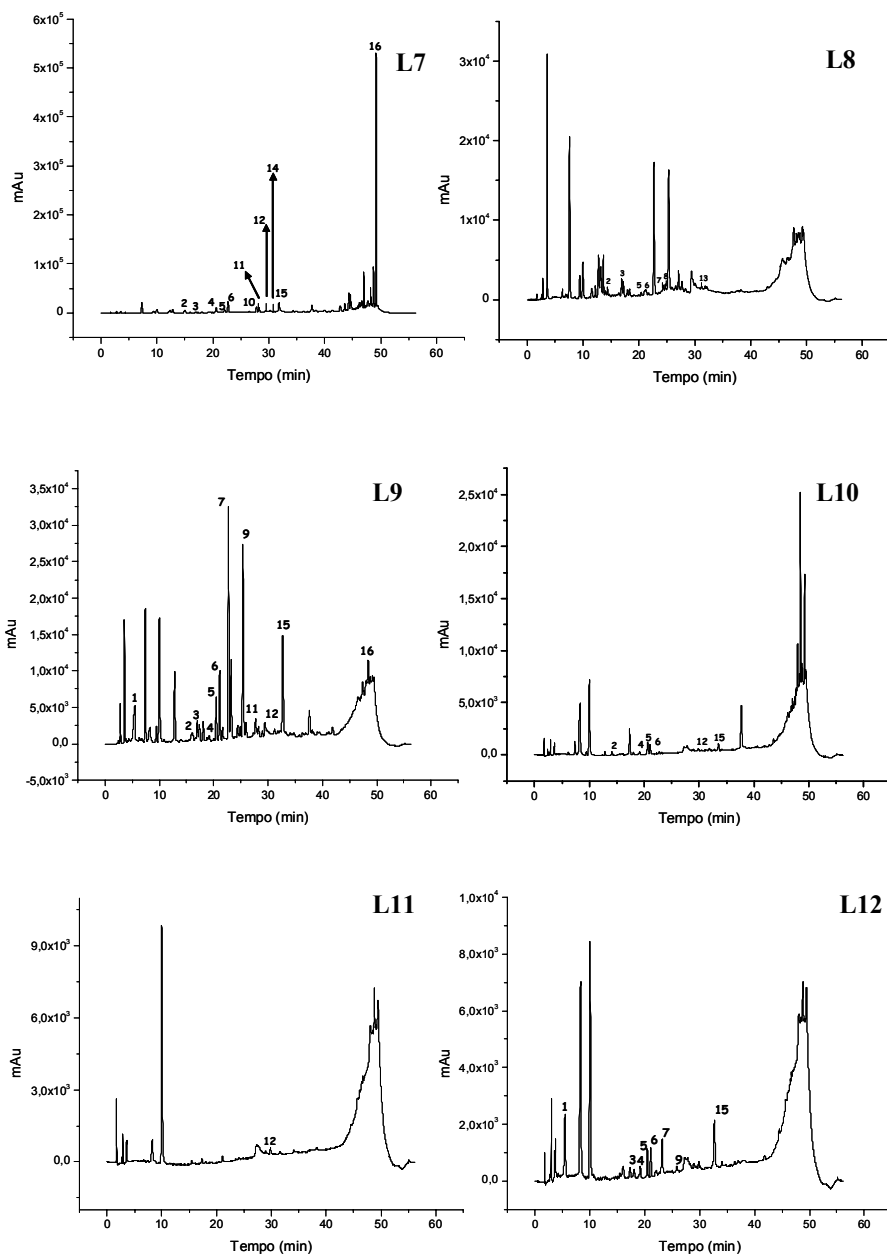


FIGURA 3E – Continuação.

**ANEXO F – Análise de variância dos valores obtidos para os compostos  
fenólicos**

	<b>Página</b>
TABELA 1F    Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos.	137

TABELA 1F – Resumo da análise de variância dos compostos fenólicos.

FV	GL	QM							
		Ácido gálico	Catequina	Ácido Vanílico	Fenol	Ácido siríngico	Vanilina	Siringaldeído	Umbeliferona
Amostra	11	28.487535	0.597763	2.041979	0.393605	2.755880	0.793393	3.978800	0.001638
Trat	1	11.384235	1.010402	1.029338	0.801317	0.844986	0.006870	0.060859	0.000043
Amostra x Trat	11	2.121497	0.114275	0.163614	0.115295	0.293460	0.187805	1.147546	0.000892
Erro	24	0.000139	0.000183	0.003939	0.003993	0.000018	0.001303	0.000047	0.000021
Media geral	47	1.4280469	0.4090448	0.5330362	0.4650009	0.4514303	0.3294510	0.7833565	0.0145502
CV (%)		0.83	3.31	11.77	13.59	0.94	10.96	0.88	31.79

FV = fator de variação; GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação.

...continua...

TABELA 1F – Continuação

FV	GL	QM							
		Ácido p-cumárico	Ácido sinápico	Ácido m-cumárico	Cumarina	4-metilumbeliferona	Ácido o-cumárico	Ácido elágico	Eugenol
Amostra	11	13.548048	0.466566	0.255302	51.453385	1.497101	0.220391	41.663456	67.821107
Trat	1	8.748178	0.013247	0.159552	0.853692	0.125178	0.162333	5.295171	5.108857
Amostra x Trat	11	2.456891	0.037664	0.133779	0.734384	0.038495	0.154512	2.749146	19.492683
Erro	24	0.003577	0.000052	0.000471	0.000039	0.000123	0.000005	0.006638	0.244252
Media geral	47	0.9119231	0.1353994	0.0977790	1.2158112	0.2786924	0.0835084	2.3500789	3.4361425
CV (%)		6.56	5.32	22.19	0.51	3.98	2.64	3.47	14.38

FV = fator de variação; GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; CV = coeficiente de variação.