



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE *Amburana  
cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith E EM AGUARDENTES DE CANA  
ENVELHECIDAS DO CEARÁ**

**Francisco Wendel Batista de Aquino**

**Fortaleza - Ceará**

**2004**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith E EM AGUARDENTES DE CANA ENVELHECIDAS DO CEARÁ**

**Francisco Wendel Batista de Aquino  
Químico Industrial**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal do Ceará.

**ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO RENATO SOARES DE CASIMIRO**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2004**

A669d

Aquino, Francisco Wendel Batista de

Determinação de compostos fenólicos em extratos de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith e em aguardentes de cana envelhecidas do ceará / Francisco Wendel Batista de Aquino.- Fortaleza: 2004.

93f.: il.

Orientador: Dr. Antonio Renato Soares de Casimiro.  
Dissertação (Mestrado) em Tecnologia dos Alimentos –  
Universidade Federal do Ceará.

1. Cachaça 2. Fenólicos 3. Amburana 4. HPLC I. Título

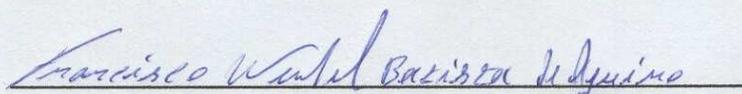
C.D.D.664  
C.D.U.663.543

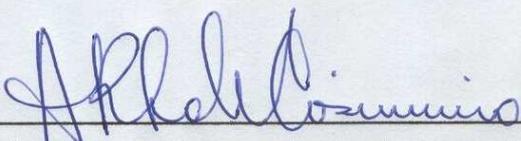
**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS DE *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith E EM AGUARDENTES DE CANA ENVELHECIDAS DO CEARÁ**

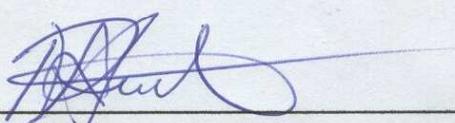
Esta dissertação foi submetida à banca examinadora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de MESTRE em Tecnologia de Alimentos, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central de referida Universidade.

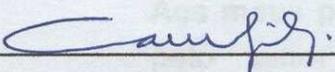
A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Dissertação aprovada em 27/09/2004

  
Francisco Wendel Batista de Aquino

  
Prof. Dr. Antonio Renato Soares de Casimiro – D. Sc.  
(Depto. de Tecnologia de Alimentos - UFC)  
– ORIENTADOR –

  
Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento – D. Sc.  
(Depto. de Química Analítica e Físico-Química - UFC)  
– MEMBRO –

  
Prof. Dr. Cláudio Ernani Mendes da Silva – D. Sc.  
(Depto. de Tecnologia de Alimentos - UFC)  
– MEMBRO –

**A Deus, por todas as coisas da vida.**

**Aos meus pais, Heron e Ana Maria,  
pelo amor incondicional e as  
minhas irmãs Elba e Ligia por  
sempre estarem ao meu lado.**

**Aos meus avós paternos e  
maternos (*In memoriam*).**

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Antonio Renato Soares de Casimiro, pela minha acolhida como orientando, pela confiança e valiosa amizade;

A Juliana Sérgio, por sua força, inspiração e sentimentos;

Ao professor, amigo e referência profissional, Ronaldo Ferreira do Nascimento, pelo convívio e ensinamentos durante a monitoria, iniciação científica e estágios;

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade do Título de Mestre;

A Francisco Eudes, por ser mais irmão que primo;

A todos os meus familiares, pela alegria que sentem em todas as minhas conquistas e por tudo que sempre fizeram por mim;

A João Osvaldo Silva Campos, pela acolhida e valiosa ajuda antes mesmo do início deste curso;

Aos amigos e amigas do Mestrado, Jonas Almada, Jaqueline Rabelo, Waleska, Celli, Cláisa, Wilma, Florisvaldo, Orlon, Ana Macdowel, Lenise, Lílian e Ana Letícia, companheiros e vencedores nesta mesma jornada;

Ao Professor Dr. Cláudio Ernani Mendes da Silva, pela participação como membro da banca;

À Professora Dra. Sueli Rodrigues, pela valiosa ajuda durante as análises finais deste trabalho;

A Jackson Carvalho, pelo apoio fundamental na conciliação das atividades profissionais na Fresenius Kabi e acadêmicas neste Mestrado;

Aos amigos da Fresenius Kabi, Edney, Jerino, Glauber, Nágela, Marcos, Tatiana, Valéria e aos demais membros do Controle de Qualidade;

Ao Paulo Alencar, secretário do Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, por toda colaboração durante o curso;

A todas as pessoas e instituições que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Foram analisados, por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, compostos fenólicos de baixo peso molecular (Ácido Gálico, 5-hidroximetilfurfural, Furfural, Ácido Vanílico, Ácido Siríngico, Vanilina, Siringaldeído, Coniferaldeído, Sinapaldeído e Cumarina) em cachaças envelhecidas, originadas de todas as regiões produtoras do Estado do Ceará e em extratos de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith. O objetivo foi o de estabelecer o perfil destes compostos na cachaça cearense e de avaliar o potencial dos extratos de Amburana como fonte destes compostos para cachaças no período de envelhecimento. A validação da metodologia analítica, baseada em procedimentos usados para a análise destes analitos em diferentes matrizes, constituiu a fase inicial deste trabalho. Em seguida, contemplou-se a comparação do conteúdo de fenólicos em extratos de Amburana em relação aos de Carvalho e de Bálsamo. Num terceiro momento, pesquisaram-se rotinas para a maximização do rendimento nos extratos de Amburana e, finalmente, realizaram-se análises em cachaças envelhecidas. Os valores encontrados foram comparados com cachaças comerciais envelhecidas de grande aceitação pelos consumidores. Em relação ao método analítico, os resultados alcançados demonstraram a conformidade da metodologia perante todos os parâmetros necessários para que o procedimento analítico obtivesse o *status* de método validado. As variações, e as novas etapas propostas para os procedimentos mais usuais de obtenção de extratos, apresentaram resultados satisfatórios e o perfil, tanto qualitativo como quantitativo, obtido para os compostos fenólicos de baixo peso molecular para as cachaças envelhecidas cearenses, revelou-se compatível com o que se tem para cachaças envelhecidas comerciais, líderes em vendas nos Estados do Ceará, Pernambuco e ainda com o de uma outra originada de Minas Gerais e distribuída nacionalmente por uma grande rede de supermercado. Desta forma, o trabalho fornece importantes informações para a condução do envelhecimento de cachaças, com ou sem o emprego de extratos, e ainda para a avaliação da veracidade, ou não, do envelhecimento atribuído a uma cachaça.

## ABSTRACT

It was analyzed, by high performance liquid chromatography - HPLC, low molecular weight phenolic compounds (Gallic Acid, 5-(hydroxymethyl)furfural(HMF), Furfural, Vanillic Acid, Syringic Acid, Vanillin, Syringaldehyde, Coniferaldehyde, Sinapaldehyde and Coumarin) in aged cachaças (sugar cane spirits), originated of all the producing regions of the Ceará State and in extracts of *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith. The objective it was established the profile of these compounds in the cachaça from Ceará and also investigated the potential of the extracts of Amburana as source of these analytes in cachaça on the aging period. The validation of the analytic methodology, based on procedures used for the analysis of these substances in different aging beverages, it constituted the initial point of this work. Soon after, the comparison of the phenolics content was contemplated in extracts of Amburana in relation to the oak and Balm. In a third moment, they were researched routines for optimize the gain in the extracts of Amburana and, finally, they took place analyses in aged cachaças. The found values were compared with aged commercial cachaças of great acceptance by the consumers. In relation to the analytic method, the reached results demonstrated the conformity of the methodology before all the necessary parameters so that the analytic procedure obtained the status of Validated Method. The variations, and the new stages proposed for the most usual procedures to obtaining of woods extracts, they presented satisfactory results and the profile, so much qualitative as quantitative, obtained for the low molecular weight phenolic compounds for the cachaça from Ceará, it was revealed compatible with the most popular commercial cachaças, leaders in sales in the States of Ceará, Pernambuco and still with the more another one originated of state of Minas Gerais and distributed nationally by a great supermarket net. This way, the work supplies important information for the conduction the aging cachaças, with or without the employment of extracts, and still for the evaluation of the truth, or not, aging attributed to one cachaça.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1. Características químicas e estruturais das madeiras usadas na construção de reservatórios para envelhecimento de bebidas .....	20
2.2. Madeiras usadas em tanoaria .....	24
2.3. Sobre a <i>Amburana cearensis</i> (A.C. Smith) .....	27
2.4. Tipos de tratamentos efetuados nas madeiras e a manufatura de tonéis....	29
2.5. A Origem dos congêneres e a sua relação com o envelhecimento das bebidas .....	33
2.6. Aspectos sensoriais e físico-químicos da cachaça envelhecida .....	39
2.7. Considerações sobre os compostos fenólicos de baixo peso molecular presentes em destilados envelhecidos .....	41
2.8. O envelhecimento de bebidas no mundo e em cachaça no Brasil.....	43
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	45
3.1. Delineamento do experimento .....	45
3.2. Material .....	46
3.2.1. Matéria-Prima .....	46
3.2.2. Padrões de envelhecimento .....	46
3.2.2.1. Cachaças .....	46
3.2.2.2. Padrões cromatográficos .....	46
3.2.3. Reagentes .....	47
3.2.4. Equipamentos .....	47
3.2.4.1. Equipamentos usados na elaboração dos extratos .....	47
3.2.4.2. Instrumental analítico .....	48
3.3. Métodos .....	48
3.3.1. Validação metodológica .....	48
3.3.2. Elaboração dos extratos pela metodologia convencional .....	51
3.3.3. Análises das cachaças envelhecidas do Ceará .....	52

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
4.1. Validação do método .....	53
4.1.1. Seletividade, faixa de trabalho e linearidade .....	53
4.1.2. Estudo da precisão e exatidão do método .....	59
4.2. Análises dos extratos .....	62
4.2.1 Avaliação do potencial da Amburana como fonte de compostos fenólicos em ralação ao Carvalho e ao Bálsamo .....	62
4.2.2. Otimização do processo de obtenção do extrato de Amburana .....	64
4.2.3. Determinação de compostos fenólicos de baixo peso molecular em cachaças envelhecidas do estado do Ceará .....	72
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	78
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Limites de congêneres permitidos pela legislação brasileira para a cachaça. ....	35
<b>TABELA 2:</b> Comprimentos de onda - $\lambda$ (nm) de máxima absorção para cada composto e comprimento de onda usado no método validado .....	49
<b>TABELA 3:</b> Valores de fluxo, gradiente, temperatura da fase móvel e tempo de retenção, para cada analito, após a otimização das condições de separação.....	50
<b>TABELA 4:</b> Tempos de retenção para os compostos analisados.....	51
<b>TABELA 5:</b> Equações das curvas de calibração, coeficientes de correlação (r), limites de quantificação (LQ) e limites de detecção (LD) para cada analito .....	57
<b>TABELA 6:</b> Relação percentual área teórica <i>versus</i> área real, obtida na verificação da linearidade do método.....	58
<b>TABELA 7:</b> Avaliação da precisão do método: Determinação do desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV, %).....	60
<b>TABELA 8:</b> Avaliação da exatidão do método: Determinação do desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV, %) .....	61
<b>TABELA 9:</b> Concentração (ppm) dos compostos fenólicos obtidos após os tratamentos térmicos de Amburana, Carvalho e Bálsamo .....	63
<b>TABELA 10:</b> Composição (ppm) para os analitos quantificados nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados .....	67
<b>TABELA 11:</b> Quantificação (ppm) de compostos fenólicos de baixo peso molecular em cachaças envelhecidas do Ceará .....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Características gerais dos componentes majoritários das madeiras.....	22
<b>FIGURA 2:</b> Características sensoriais conferidas à cachaça por diferentes madeiras brasileiras.....	26
<b>FIGURA 3:</b> A Amburana ( <i>Amburana cearensis</i> ) .....	28
<b>FIGURA 4:</b> Esquema simplificado das etapas que envolvem a fabricação de um barril .....	32
<b>FIGURA 5:</b> Mecanismos simplificados de formação de compostos fenólicos de baixo peso molecular e ésteres a partir da madeira.....	38
<b>FIGURA 6:</b> Reações de esterificação e transesterificação ocorridas ao longo do envelhecimento. ....	41
<b>FIGURA 7:</b> Espectro UV/VIS da Vanilina.....	49
<b>FIGURA 8:</b> Sobreposição de cromatogramas ressaltando a seletividade do método .....	54
<b>FIGURA 9:</b> Sobreposição de cromatogramas da primeira das três séries de injeção dos padrões usados para confecção da curva de calibração.....	56
<b>FIGURA 10:</b> Resposta do detector em função da concentração do analito na faixa de trabalho do método .....	59
<b>FIGURA 11:</b> Proporções entre os compostos fenólicos analisados para cada madeira .....	63
<b>FIGURA 12:</b> Concentração total (ppm) dos analitos nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados.....	68

<b>FIGURA 13:</b> Distribuição (ppm) dos analitos nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados .....	70
<b>FIGURA 14:</b> Sobreposições de cromatogramas de extratos obtidos com uso de microondas e estufa a 200°C, de amostras de cachaça s envelhecidas .....	71
<b>FIGURA 15:</b> Comparativo entre os valores médios (ppm), determinados para cada analito nas amostras analisadas de cachaças cearenses envelhecidas .....	75
<b>FIGURA 16:</b> Comparativo entre os valores médios (ppm) determinados para cada analito nas amostras de cachaças cearenses envelhecidas e nas cachaças envelhecidas de referência analisadas .....	76
<b>FIGURA 17:</b> Comparativo entre o teor médio dos compostos fenólicos (ppm), de baixo peso molecular, analisados nas amostras de cachaças envelhecidas do Ceará e nas cachaças de referência.....	77

# 1. INTRODUÇÃO

Definida, oficialmente, como a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius e com características sensoriais peculiares (BRASIL, 2002), a cachaça, com sua origem datando do século XVII, quando a cana-de-açúcar começou a ser plantada na região nordeste em meio à colonização portuguesa (CARVALHO, 1988), é bebida tradicional do Brasil, da mesma maneira que em outros países no mundo também há bebidas que em muitos casos chegam até mesmo a fazer parte das suas tradições.

Já a aguardente de cana, por esta mesma legislação, é definida como a bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida de destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro (BRASIL, 2002).

Historicamente, a produção de cachaça no Ceará também teve início em meados do século XVII nas regiões do Cariri, Ibiapaba e do Maciço de Baturité, sem caráter comercial, o que só passou a ocorrer a partir do século XVIII, conforme Thomaz Pompeu de Souza Brasil (*Apud* SINDIBEBIDAS, 1992). De maneira que, hoje, o Ceará figura entre os maiores produtores de cachaça do Brasil, com destilarias de pequeno e médio distribuídas por todo o Estado e de grande porte localizadas somente na Região Metropolitana de Fortaleza (PINHEIRO, 1999).

Atualmente, o Brasil conta com mais de cinco mil marcas de cachaça, cerca de trinta mil produtores disseminados por todo o seu território, gerando aproximadamente quatrocentos mil empregos diretos e indiretos, uma receita próxima de quinhentos milhões de reais ao ano (LOPÉS, 2003; PBDAC, 2004), fechando o ano de 2003 com uma produção estimada de dois bilhões de litros, onde menos de um por cento deste montante foi exportado (VASCONCELOS, 2003).

Apesar destes números, a cachaça por muito tempo foi estigmatizada por ter sua origem nas classes menos favorecidas da população brasileira e, apenas recentemente, é que ações realmente concretas foram tomadas no intuito de valorizar a imagem da cachaça como bebida genuinamente nacional, e organizar o setor produtor para capacitá-lo a disputar o mercado internacional, onde se destacam:

- A criação, pela ABRABE - Associação Brasileira das Indústrias de Bebidas, do Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça - PBDAC em 1997 (LÓPEZ, 2003);
- A sua inclusão no Programa Especial de Exportações do Governo Federal;
- A adoção de medidas legais que definiram a cachaça como produto genuíno do Brasil (BRASIL 1997, BRASIL 2001, BRASIL 2002).

Mesmo com a inegável importância destas ações, é consenso entre os pesquisadores, produtores e apreciadores da cachaça, de que não basta apenas que a cachaça atenda aos requisitos legais estabelecidos para sua produção e composição química, para torná-la uma bebida detentora do “*status*” de bebida fina (BOZA; OETTERER, 1999; CAMPOS, 2000; FURTADO, 1994; PINHEIRO, 1999), de forma que as quatro etapas necessárias para a obtenção de uma aguardente (Preparo e obtenção do mosto, fermentação, destilação e envelhecimento) passaram a ser alvo de investigações científicas que se intensificaram, principalmente a partir de 1990.

Um outro ponto de convergência entre os que estão “ligados” à cachaça é o de que, por melhor que sejam realizadas as três primeiras etapas do seu processo produtivo, o destilado recém obtido apresentará sabor seco, ardente e um aroma não muito agradável (BOZA; OETTERER, 1999; CARDELLO; FARIA, 2000, Cerdán, 2002; ESCALONA, *et al.*, 2002; PLAZA, *et al.*, 2002). De maneira que o envelhecimento se torna fundamental para que a cachaça adquira as características desejadas pelos seus consumidores, pois ao longo deste período a bebida apresenta os atributos necessários de cor, aroma e sabor típicos dos destilados de alta qualidade (MOSEDALE; PUECH, 1998; CALDEIRA, *et al.*, 1999; CAMPOS, 2000; FARIA *et al.*, 2003).

Para uma eficiente condução no envelhecimento dos destilados, são necessários cuidados para a manutenção do teor alcoólico da bebida em função das perdas por evaporação (SINGLETON, 1995), conhecimentos das características físico-químicas das madeiras dos tonéis, da composição química da bebida, das características sensoriais esperadas dentre outras (MOSEDALE; PUECH, 1998).

Internacionalmente, o carvalho é a madeira tradicionalmente usada na confecção de barris para o envelhecimento e guarda dos mais variados tipos de bebidas (uísque, vinho, conhaque, etc.), existindo para ele uma vasta literatura (DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, 1998; CHATONNET, *et al.*, 1999; CANAS, S.; *et al.*, 2000), que se estendem, inclusive, a investigações sobre o uso dos seus extratos com o intuito de serem incorporados às bebidas fermentadas e/ou fermento-destiladas, reduzindo o tempo do envelhecimento (PUECH, 1988; BOWEN *et al.*, 1994; MARINOV, 1996).

No Brasil, o uso de extratos de madeiras é realizado, na maioria das vezes, de maneira empírica e praticamente restrito a produções artesanais, de modo que a reduzida literatura a este respeito contém poucos trabalhos, cujo foco está voltado para a investigação do emprego dos extratos de madeiras regionais como agentes bonificadores durante o envelhecimento da cachaça.

A literatura internacional, principalmente a referente ao whisky e o vinho, aponta vários compostos que podem ser utilizados como marcadores de envelhecimento em bebidas, dentre os quais temos os compostos fenólicos de baixo peso molecular, que são extraídos da madeira durante o seu período de guarda por vários mecanismos de degradação da celulose, hemicelulose e da lignina que se constituem nos componentes majoritários da madeira (CANAS *et al.*, 1999; CHATONNET, 1999; MONEDERO *et al.*, 2000; PIGGOTT; HUNTER; MARGOMENOU, 2000).

Os trabalhos de CAMPOS (2000) e mais recentemente, (CAMPOS *et al.*, 2004) são, provavelmente, os únicos a tratarem do tema realizados no Ceará, inexistindo ainda dados quantitativos sobre os compostos fenólicos de baixo peso molecular em amostras oriundas de todas as regiões produtoras do Estado.

Pelo exposto, o presente trabalho tem como objetivo:

- Validar uma metodologia analítica para determinação dos compostos fenólicos de baixo peso molecular (Ácido Gálico, 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF), Furfural, Ácido Vanílico, Ácido Siringico, Vanilina, Siringaldeído, Coniferaldeído, Sinapaldeído e Cumarina), via cromatografia líquida de alta eficiência, que será aplicada durante todo o trabalho, proporcionando confiabilidade aos resultados alcançados.
- Avaliar o potencial da *Amburana cearensis*, como fonte dos compostos fenólicos citados, por meio da comparação de extratos da mesma com extratos de Carvalho e Bálamo, que serão obtidos por de uma metodologia descrita pela literatura internacional;
- Verificar as variações nos extratos de *Amburana cearensis* A.C. Smith, originadas por variações no processo de obtenção, como o uso da *Amburana* em pó, o tratamento térmico por microondas, o emprego de banhos ultrasônicos etc., que buscarão a maximização do seu rendimento, empregando como parâmetros os níveis dos compostos fenólicos de baixo peso molecular, determinados e quantificados pela metodologia validada
- Analisar cachaças envelhecidas das principais regiões produtoras do Estado, determinando a presença e as concentrações dos analitos estudados, buscando características referentes as cachaças envelhecidas de cada região.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Por mais criterioso que tenha sido o processo de obtenção da cachaça, ou de outras bebidas como o whisky ou o rum, o destilado recém obtido será sensorialmente pobre, transparente, com sabor seco, ardente, de odor pungente e desagradável, devido às altas concentrações de álcoois e ácidos contidos no produto fresco, o que o torna de difícil degustação. Com o envelhecimento, obtém-se um decréscimo gradativo destes compostos e uma simultânea elevação no teor de ésteres que, presentes na diversificada e complexa mistura de substâncias em equilíbrio, tornam a cachaça detentora de adjetivos como macia, suave e doce, os quais são usados freqüentemente pelos consumidores ao referir-se a bebidas de alta qualidade (CARDELLO; FARIA, 1998; LEE *et al.*, 2001; ESCALONA *et al.*, 2002).

O envelhecimento, além de benéfico, se faz necessário, pois no seu decorrer são gerados os congêneres que agregam valores sensoriais e, conseqüentemente, financeiros aos destilados, de forma que, em função das peculiaridades existentes no processo de envelhecimento, como os aspectos da tanoaria (capacidade do recipiente, tipo de madeira, intensidade da sua queima, número de virtudes do tonel, etc), ambientais (temperatura e umidade) e o tempo de guarda propriamente dito, etc, um destilado pode vir a ser detentor de características singulares que o valorize e destaque em relação aos demais.

Do ponto de vista científico, devido à diversidade de fatores influentes na maturação de destilados, continuamente, temos trabalhos sendo publicados sobre o envelhecimento de bebidas destiladas e fermentadas englobando aspectos distintos como:

- Sensoriais: Nesta área tem-se a busca de descritores sensoriais para aguardentes envelhecidas, formação de câmaras de provas, estudos de tendência de mercado em função das características do público consumidor (CALDEIRA *et al.*, 1998; CARDELLO; FARIA, 2000; LEE *et al.*, 2001; CALDEIRA *et al.*, 2002).

- Tecnológicos: Procura por novas madeiras para tanoaria, investigação dos efeitos causados por variações na manufatura dos barris, empregos de extratos de madeiras (CHATONNET *et al.*, 1999; MONEDERO *et al.*, 2000; FARIA *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2004).
- Analíticos e Forenses: Desenvolvimentos de novas metodologias analíticas aplicáveis no monitoramento do envelhecimento por meio de compostos marcadores, na avaliação da autenticidade de destilados, na elucidação da gênese dos congêneres, em estudos quimiométricos etc. (BRONZE; VILAS BOAS; BELCHIOR, 1997; VANDERHAEGEN *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2004).
- Fisiológicos e toxicológicos: Impulsionadas pelo fato amplamente reconhecido de que o consumo moderado de bebidas alcoólicas pode reduzir o risco de morte por doenças coronarianas, devido a habilidade do etanol em elevar a quantidade de lipoproteínas de alta densidade (CRIQUI, 1996; KANNEL; ELLISON, 1996) e de reduzir a coagulabilidade do sangue (RUBIN; RAND, 1994), além dos tradicionais estudos com vinhos, trabalhos são direcionados no conhecimento do potencial antioxidante e nas propriedades sequestrantes de radicais livres dos constituintes fenólicos e furânicos presentes em destilados envelhecidos (GOLDBERG *et al.*, 1999; HASLAM, 1999; TEDESCO, *et al.*, 2000) e, ainda, na investigação toxicológica de compostos extraíveis das madeiras (LKAM *et al.*, 2003).

## **2.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DAS MADEIRAS USADAS NA CONSTRUÇÃO DE RESERVATÓRIOS PARA ENVELHECIMENTO DE BEBIDAS.**

São conhecidas mais de 350.000 espécies de vegetais. Entretanto, o número de espécies que reúne as características necessárias para serem empregadas em tanoaria é, proporcionalmente, muito pequeno, pois para que uma madeira seja utilizada na manufatura de barris e tonéis de envelhecimento ela deverá apresentar uma considerável resistência, flexibilidade, facilidade de laminação, porosidade, inocuidade aos materiais que nela serão colocados e ainda ser economicamente viável (BOZA; OETTERER, 1999; CAMPOS, 2000), de maneira que o carvalho

(*Quercus* sp.), tradicionalmente usado para este propósito, ilustra muito bem este fato, pois dos seus mais de 250 tipos, apenas o Carvalho branco (*Quercus alba*), usado nos Estados Unidos e na Europa, e Carvalho espanhol (*Quercus sessilis* ou *Q. rubor*), usado somente na Europa, constituem a maioria dos recipientes existentes para envelhecimento (RIZZON, 1993; TONÉIS & CIA, 2004).

O sistema de classificação Filogenético secciona o reino vegetal em quatro grupos principais: *Thallophyta*, *Bryophyta*, *Pteridophyta* e *Spermatophyta*, sendo neste último grupo encontradas as madeiras utilizadas em tanoaria, constituídas basicamente por Celulose, Hemicelulose, Lignina e Materiais Estranhos (D'ALMEIDA, 1981).

<p><b>CELULOSE</b></p>	<p>Responsável por 40 a 45% do peso seco da madeira, constitui-se no componente principal da sua parede celular. Quimicamente, é um homopolissacarídeo formado por cadeias retilíneas de anidro D-glucose, unidas do tipo <math>\beta</math>-1,4. apresenta uma maior resistência à hidrólise (resistência da ligação <math>\beta</math>-1,4) em meio ácido do que os demais componentes majoritários da madeira. (D'ALMEIDA, 1981).</p>
<p><b>HEMICELULOSE</b></p>	<p>Trata-se de um oligossacarídeo que serve como matriz para a formação da celulose, podendo ser composto por unidades de glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, raminose, 4-O-metilglucorônico e resíduos de ácido galactorônico. Sua participação em peso seco é variável de madeira para madeira, o mesmo ocorrendo com os percentuais das suas unidades formadoras, sendo assim uma das razões para as diferentes quantidades de compostos oriundos da madeira na bebida envelhecida (MAGA 1989).</p>
<p><b>LIGNINA</b></p>	<p>Quimicamente, trata-se de um copolicondensado de produtos desidrogenados, derivados do álcool hidroxicinamil <i>p</i>-coumaril, álcoois coniferil e sinapil, e unidades de fenol que possibilitam a formação de vários outros compostos (MAGA, 1989). Tem como finalidade unir o tecido celular dos vegetais, sendo o terceiro componente em quantidade dos mesmos. Está associada com a hemicelulose, não só através de misturas físicas, mas também por meio de ligações covalentes, não sendo decomposta pela água (D'ALMEIDA, 1981). Pela etanólise da lignina, são extraídos da madeira durante o envelhecimento, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, entre outros compostos responsáveis pela agradabilidade dos destilados maturados (NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989; MOSEDALE; PUECH, 1998).</p>

**FIGURA 1** – Características Gerais dos Componentes Majoritários das Madeiras.

Quanto aos compostos estranhos, estes são os mais diversos, não pertencem à parede celular e variam principalmente em função de fatores genéticos e ambientais, de natureza orgânica ou inorgânica, são responsáveis pelas características dos vegetais que vão da cor ao cheiro e ao gosto. Estes compostos não são de distribuição uniforme e tampouco de ocorrência obrigatória em todas as madeiras. No tocante a sua condição, quando presentes nas madeiras usadas na fabricação de recipientes para envelhecimento ou para obtenção de extratos, podem ser divididos em duas classes: Compostos Extrativos e Compostos Não Extrativos.

Os Compostos Extrativos são de natureza orgânica e recebem esta denominação por serem deslocados da madeira por vias clássicas como extração com água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados por vapor (D'ALMEIDA, 1981). Devido a extração não ser fixa a um único solvente, nesta classe, temos os compostos pertencentes as diferentes funções orgânicas:

- Ácidos Graxos  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Voláteis} \\ \text{Resinosos} \end{array} \right.$
- Óleos Voláteis
- Esteróides
- Compostos insaponificáveis
- Alcoois Polihidroxilados
- Carboidratos Solúveis
- Compostos Aromáticos
- Taninos  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Condensáveis} \\ \text{Hidrolisáveis} \end{array} \right.$

Os Compostos Não Extrativos são todos que, via de regra, normalmente não são transferidos da madeira para a bebida por métodos convencionais sendo representados na sua grande maioria por:

- Compostos Inorgânicos
- Proteínas
- Substâncias Pécnicas.

Em tanoaria, ou nos procedimentos para obtenção de extratos somente os troncos das árvores são usados. Morfologicamente, o tronco é dividido em casca, floema ou líber, câmbio e lenho, sendo apenas a porção do tronco referente ao lenho explorada para estes fins (MOSEDALE; PUECH, 1998, CAMPOS, 2000).

O lenho é distribuído em duas regiões, o cerne e o albúrnio que possuem proporções variáveis dependendo da espécie de árvore. O cerne é caracterizado por ter uma tonalidade mais escura e estar localizado na sua região. Já o albúrnio tem cor clara e encontra-se próximo ao câmbio (AMABIS; MARTHO, 1997).

## **2.2. MADEIRAS USADAS EM TANOARIA**

Na Europa e Estados Unidos às opções de madeira para estes fins ficam praticamente registradas a alguns tipos de carvalho (*Quercus* sp.) (RIZZON, 1993; TONÉIS & CIA, 2004).

O Brasil, embora não tenha uma tradição com relação aos estudos sistemáticos na busca de madeiras para envelhecimento de cachaça, vem nos últimos anos mostrando sinais de alterações neste quadro. Há trabalhos científicos que, por vezes possuem seus pontos de partida na investigação de madeiras que são utilizadas por pequenos produtores que fabricavam seus produtos de maneira predominantemente artesanal. Em outros momentos, o estudo de cachaças envelhecidas é feito em tonéis de carvalho, muitas vezes importados, usados dos Estados Unidos ou Europa, devido esta não ser uma espécie nativa da nossa flora e pelo seu custo. Desta maneira, tonéis de cedro e balsamo, por exemplo, que já são bem difundidos pelo Brasil, vêm agora sendo alvo de estudos, juntamente com

outras espécies de madeiras (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; BOZA; OETTERER, 1999; CAMPOS, 2000; CAMPOS *et al.*, 2004; FARIA *et al.*, 2003).

Dos trabalhos realizados, é possível estabelecer algumas características sensoriais que a cachaça passa a exibir após ser maturada em tonéis confeccionados com madeiras brasileiras como, por exemplo, o Amendoim (*Pterogyne nitens*), Bálsamo ou Cabriúva (*Myroxylon peruiferum* L.F.), Ipê (*Tabebuia* ssp.), Jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze), Amburana (*Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith), vinhático (*Plathymentia foliolosa* Bent.), Freijó (*Cordia goeldiana* Huber), Castanheira do Pará (*Cordia goeldiana* Huber). Todavia, a maioria das publicações ainda não explorou aspectos tecnológicos como, por exemplo, a avaliação da qualidade da cachaça envelhecida, em função do tempo e do tipo de tratamento térmico dispensado a madeira usada na confecção de tonéis, a obtenção de extratos de madeiras que podem ter aplicações como aceleradores de envelhecimento, na composição de cachaças que apresentem características de mais de um tipo de madeira, dentre outras aplicações (DIAS; MAIA; NELSON, 1998; BOZA; OETTERER, 1999; CAMPOS, 2000; FARIA *et al.*, 2003).

<b>MADEIRA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS CONFERIDAS</b>
<b>Amendoim</b>	Baixa a acidez e preserva as características naturais da cor.
<b>Bálsamo ou Cabriúva</b>	Resulta em tom amarelinho e numa cachaça de gosto forte.
<b>Ipê</b>	Garante uma cachaça que desce macio e um tom alaranjado.
<b>Jequitibá Rosa</b>	Elimina o leve gosto de bagaço de cana sem alterar a cor.
<b>Amburana</b>	Baixa a acidez e diminui o teor alcoólico da cachaça, que fica mais suave, mantendo a cor normal.
<b>Vinhático</b>	Fornece cor amarelo-ouro e gosto próximo ao da cachaça pura.
<b>Grápia ou Garapa</b>	Baixa a acidez e diminui o teor alcoólico da cachaça, que fica mais suave, mantendo a cor normal.
<b>Louro Freijó</b>	Baixa a acidez e diminui o teor alcoólico da cachaça, tornando-a mais suave, mantendo a cor normal.
<b>Castanheira do Pará</b>	Tem propriedades semelhantes ao Carvalho Europeu, no envelhecimento da Cachaça, transmitindo suavidade e uma cor amarelada.

**FIGURA 2** – Características sensoriais conferidas à cachaça por diferentes madeiras brasileiras.

Fonte: TONÉIS & CIA., 2004.

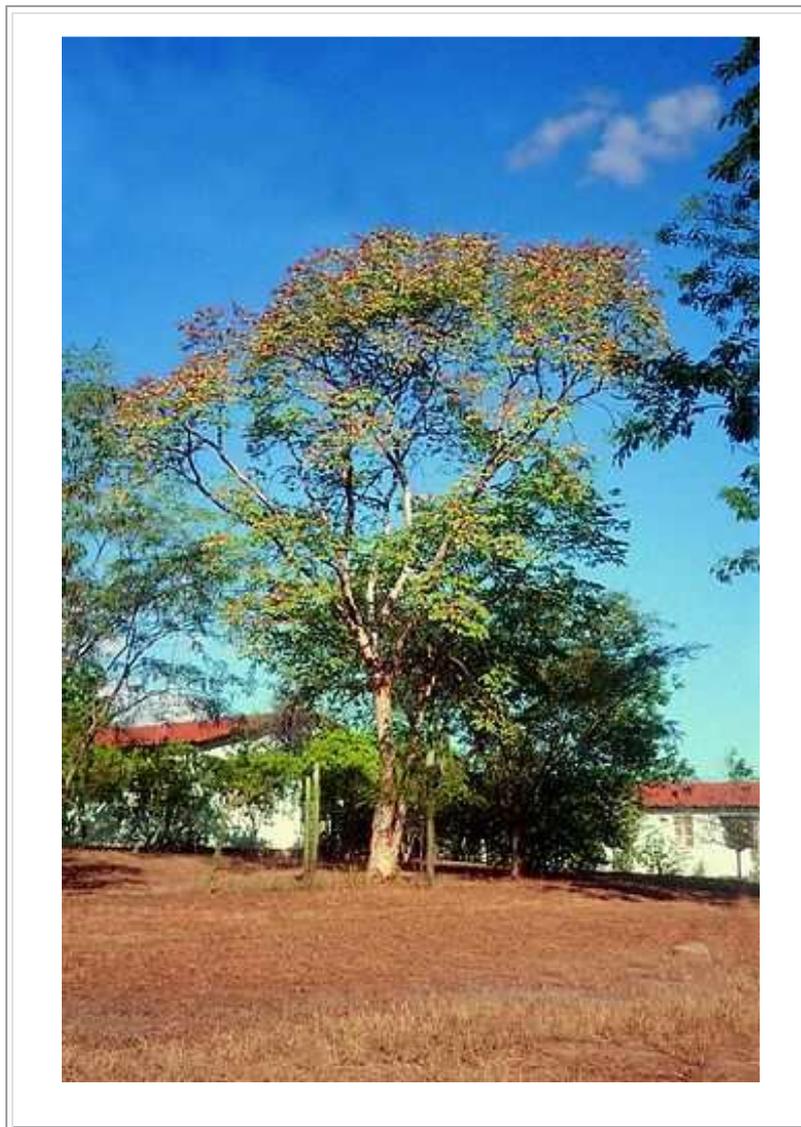
### 2.3. SOBRE A *AMBURANA CEARENSIS* (A.C. SMITH)

O táxon *Amburana* é formado por apenas duas espécies, *A. acreana* e *A. cearensis*, sendo a *Amburana cearensis* originária do Nordeste brasileiro, e pode ser encontrada nas matas do sudeste, chegando a estender-se até a Argentina (CANUTO, 2002).

Dependendo da região em que é encontrada, é conhecida popularmente como ambura-de-cheiro, cerejeira-rajada, cumaru-das-caatingas, cumaru-de-cheiro, cumaru-do-Ceará, imburana ou, simplesmente, Amburana. Esta espécie é freqüentemente confundida com a espécie *Dipteryx odorata* devido à denominação popular comum de cumaru, além de ser, equivocadamente, classificada como pertencente aos gêneros *Pterodon* ou *Stryphnodendron* (PIO CORRÊA, 1984).

De acordo com PIO CORRÊA (1984), *A. cearensis* A.C. Smith pode ser descrita como:

“Árvore regular, até 15 metros de altura e 50 centímetros de diâmetro; possui casca grossa, suberosa, gordurosa, aromática, vermelho-pardacenta, e que se desprende em finas lâminas; ramos novos cilíndricos; folhas alternas, irregularmente pinadas, composta de 11-15 folículos alternos, peciolados, ovados, arredondados no ápice e na base, inteiros, nervura dorsal saliente, flores brancacentas, ou branco-amareladas, ou amarelo-pálido, aromáticas, pequenas, dispostas em racimos axilares, multiflorida; ovário longo-estipitado; fruto vagem achatada, escura, quase preta, contendo uma semente alada e rugosa. Fornece madeira de alburno branco-acizentado e cerne amarelo-castanho, normalmente avermelhado e com tons verde-azeitoa, assetinada, raios e poros fracamente visíveis”.



**FIGURA 3** – A Amburana (*Amburana cearensis*).  
Fonte: PLANTAMED, 2004

Suas comprovadas propriedades antiinflamatórias e broncodilatadoras são bastante exploradas por meios de xaropes fabricados com a sua casca, em que a cumarina é o seu princípio ativo. Entretanto, este e outros compostos fenólicos presentes na planta são, freqüentemente, investigados a fim de que se tenha a certeza que estes não provoquem danos ao homem (MATOS, 1994).

Equipes independentes, coordenadas por LKAM (2003; 2003) investigaram além das propriedades antiinflamatórias, o aspecto músculo-relaxante e toxicológicos de extratos hidroalcoólicos de ***Amburana cearensis***, onde foram

obtidos resultados promissores a respeito destas propriedades terapêuticas e da atoxidade destes extratos, o que contribui para fortalecimento dos estudos visando o emprego desta em tanoaria e na elaboração de extratos para uso como bonificadores no envelhecimento acelerado de aguardentes (LKAM *et al.*, 2003a, 2003b).

## **2.4. TIPOS DE TRATAMENTOS EFETUADOS NA MADEIRA E A MANUFATURA DE TONÉIS**

A madeira destinada à tanoaria não deve ser usada nas condições em que se encontra imediatamente após sua obtenção. Desta maneira, os métodos para construção de recipientes para envelhecimento, ou guarda momentânea de bebidas, não são uniformes, podendo assumir diferenças consideráveis em função das características botânicas de cada espécie vegetal, da idade da árvore, das condições ambientais do local de onde a madeira foi obtida, entre outras (MARCO *et al.*, 1994)

Os tratamentos aplicados na madeira visam, de forma geral, eliminar a água que não se encontra ligada quimicamente à madeira, diminuir a quantidade de compostos causadores de adstringência no produto envelhecido como, por exemplo, taninos e resinas, aumentar a área de contato entre a bebida e o recipiente para maximizar a extração das substâncias desejáveis, nomeados genericamente de compostos fenólicos de baixo peso molecular (CHATONNET; BOIDRON, 1990; CANAS *et al.*, 1999).

Segundo MOSEDALE & PUECH (1998) e SCHAHINGER (1995), após o tronco da árvore escolhida ser submetido a uma secagem preliminar, cortado e laminado, a madeira obtida deverá ser submetida a um período de secagem natural ao ar livre que pode durar até três anos. Embora a secagem artificial em fornos seja seguramente mais rápida e econômica, a secagem nos moldes tradicionais propicia melhores resultados devido uma maior redução dos taninos da madeira através de reações de condensação e de polimerização destes, que podem ser ainda mais acentuadas quando estas reações são catalisadas por enzimas, ou

no momento em que os taninos são lixiviados por água de chuva (MOSEDALE; PUECH, 1998).

Após a montagem dos barris, outros procedimentos podem ser aplicados para a redução de taninos como a passagem de vapor pelo seu interior, lavagens sucessivas com água fervente ou com solução diluída de ácido sulfúrico.

Para SCHAHINGER (1995), outro benefício da secagem em que o teor de umidade na madeira não ultrapasse os 14%, será uma madeira mais dura, rígida e tensa, tornando-a assim difícil de ser curvada, o que, no entanto, para confecção de barris será um atributo de qualidade, pois no rejuntamento lado a lado, ocorrerão pressões laterais maiores evitando possíveis vazamentos, inclusive após tempo considerável de uso.

Uma das etapas de maior importância na fabricação de tonéis ou barris é a queima das aduelas que pode ser efetuada antes ou após a montagem. Entretanto, a execução deste procedimento é, na grande maioria das vezes, efetuado com o recipiente montado, pelas técnicas de queima americana que emprega madeira em brasa ou pela européia que usa um queimador metálico (BOZA; OETTERER, 1999; CANAS *et al.*, 1999; CHATONNET *et al.*, 1999). Quanto a intensidade da queima, esta pode ser classificada em três níveis: branda ou light (115 – 125°C), média (200 – 215°C) e forte (220 – 230°C) (CHATONNET *et al.*, 1999).

Pesquisas demonstram que a queima da madeira dos barris ou tonéis promove vários benefícios à bebida como:

- Formação de uma camada de carvão ativo, adsorvente altamente eficiente na remoção de congêneres indesejáveis, bem como na catalise de reações;
- A lignina é degradada na camada sob o carvão, cujo compostos aromatizantes são liberados lentamente para a bebida, de maneira que quanto maior for o tempo repouso, maior será a quantidade destes compostos, que atualmente são considerados bonificadores e marcadores que atestam a maturação de uma bebida.
- Aumento dos extratos totais, corantes e fenóis devido à ruptura da superfície da madeira e ao aumento da área superficial efetiva passível de produzir

congêneres através de reações oxidativas (PHILIP, 1989; PUECH & MAGA, 1993; CAMPOS *et al.*, 2004).

Na indústria de bebidas, a reutilização de barris é uma prática comum, mesmo sendo bastante conhecido o fato de que existe uma marcante redução na concentração de compostos extraíveis da madeira. BOSCOLO (1996) demonstrou a diminuição fenóis, de praticamente 50% da primeira para a segunda utilização, para melhorar a performance de barris usados, adotando uma nova queima do barril. Entretanto, alguns pesquisadores já desenvolveram trabalhos buscando alternativas como o emprego de extratos de madeira sozinhos, ou em associação com uma nova queima do barril (PUECH, 1988; MARINOV, 1996).

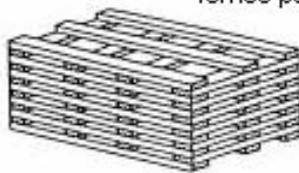
## MANUFATURA DE UM BARRIL

Os troncos são cortados no comprimento desejado e as aduelas são divididas.



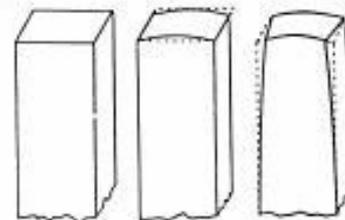
### SECAGEM

A madeira é seca ao ar livre por períodos de até 3 anos. Em alguns casos é seca em fornos posteriormente.



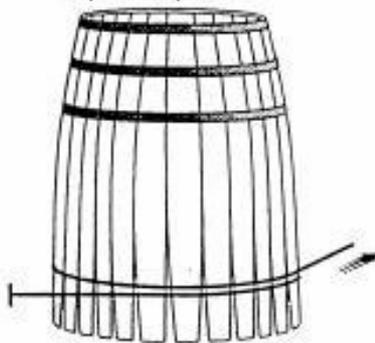
...as aduelas são laminadas

Aplanadas, curvadas e articuladas



### MONTAGEM DO BARRIL

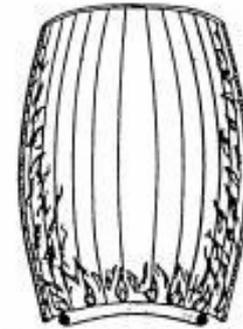
Na montagem do barril, o mesmo é dobrado por molinetes ou por máquinas



A madeira é umedecida por fora e aquecida por dentro.

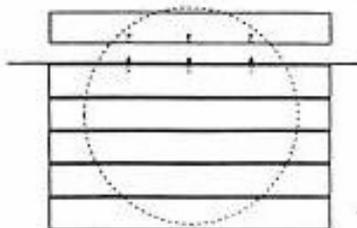


Pela técnica o barril é dobrado sobre um braseiro por 20 min. em média e posteriormente sofre um novo aquecimento.  
5 - 10 min. aquecimento leve;  
10 - 15 min. aquecimento médio;  
15 - 20 min. aquecimento forte.



Pela técnica americana o barril é dobrado em contato com vapor e tostado por um queimador a gás.  
15 s: tostagem leve;  
30 s: tostagem média;  
45 s: tostagem forte.

### MONTAGEM DA TAMPA



Finalmente os últimos aros são adicionados e o barril é testado com água quente.



**FIGURA 4** – Esquema simplificado das etapas que envolvem a fabricação de um barril.

Fonte: Adaptado de MOSEDALE; PUECH, 1998.

## 2.5. A ORIGEM DOS CONGÊNERES E A SUA RELAÇÃO COM O ENVELHECIMENTO DAS BEBIDAS

Além do etanol e da água, a cachaça contém em menor concentração uma grande quantidade de compostos orgânicos, denominados genericamente de congêneres, os quais são incorporados ao longo de todo o seu processo produtivo (BRASIL, 1997) e responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (SPILLMAN *et al.*, 1997).

Quimicamente, os congêneres presentes na cachaça e nas demais bebidas fermento-destiladas, pertencem em sua grande maioria às seguintes funções orgânicas:

- **Aldeídos:** Em geral, os aldeídos desejáveis são os com mais de dez átomos de carbono, pois apresentam aromas agradáveis. Já os que possuem até oito átomos de carbono, são indesejáveis por terem aromas pungentes e enjoativos (MAIA, 1994).

O conteúdo total de aldeídos na cachaça é expresso em acetaldeído que é o seu aldeído majoritário, o qual é derivado da degradação da lignina (PISARNITSKII, 1995).

Entre os aldeídos, o furfural e o hidroximetilfurfural merecem destaque, pois ao contrário dos demais não são formados durante a fermentação e sim originados, respectivamente, da desidratação parcial das pentoses e da desidratação das hexoses. Desta forma, os seus teores podem ser tomados como indicativos de queima da folhagem da cana antes da sua colheita, de excessos de temperatura durante a destilação e em associação com outros congêneres como evidências de envelhecimento da cachaça (MAIA, 1994; BOZA; HORII, 1999; MORAIS, 2001).

- **Álcoois:** Merecem destaque o metanol e os álcoois superiores. Quanto ao metanol, este composto de origem associada à degradação da pectina é particularmente indesejável já que sua ingestão mesmo em doses muito pequenas pode levar à cegueira e até à morte (WINDHOLZ, 1976).

Os álcoois superiores, formados durante a fermentação, em conjunto com os ésteres, contribuem largamente com o aroma e o sabor da cachaça. Conhecidos como óleo fúsel, os álcoois amílico, iso-amílico, proílico, iso-propílico, butílico, iso-butílico em grande quantidade diminuem a qualidade da cachaça e o seu valor comercial, enquanto que álcoois com mais de cinco átomos de carbono encontram-se em quantidades diminutas na cachaça (CHAVES, 1998).

- **Ácidos:** Mesmo nas fermentações alcoólicas de controle mais rigoroso, o ácido acético é um co-produto, normal, gerado por conversão do açúcar, podendo desta forma estar presente no mosto fermentado em concentrações de até 0,8g/L e chegar a valores da ordem de 30% do açúcar, caso ocorra aeração do mosto (MAIORELLA, 1989).

São, também, importantes os ácidos pirúvico, cítrico, succínico e oxaloacético, pois em conjunto com o ácido acético contribuem sensorialmente para a cachaça, de modo direto ou indiretamente como no caso destes, por originarem ésteres.

- **Ésteres:** Durante a fermentação alcoólica, uma pequena parte do etanol reage intracelularmente com o ácido acético, formando o acetato de etila (representando 80% do conteúdo total dos ésteres) e pelo mesmo mecanismo outros álcoois também produzidos intracelularmente reagem com o ácido acético formando outros ésteres (KORHOLA; HARJU; LEHTONEM, 1989). De modo geral, os ésteres são desejáveis, devido favorecerem a melhoria do aroma da bebida. Cada éster apresenta um aroma em particular característico, onde os que possuem aromas mais acentuados são os que se originam de álcoois de baixo peso molecular. Conforme demonstrado por dados experimentais obtidos por REAZIN (1981), os ésteres são os compostos que apresentam o crescimento mais linear ao longo do envelhecimento do destilado.

Oficialmente os limites para os congêneres pertencentes aos grupos anteriormente descritos, estão estabelecidos na cachaça brasileira pelo decreto nº. 2.314 de 04 de setembro de 1997, e são apresentados na tabela 1.

**TABELA 1** – Limites de congêneres permitidos pela legislação brasileira para a cachaça.

<b>CONGÊNERE</b>	<i>CONCENTRAÇÃO (g/100mL AA)</i>	
	<b>MÍNIMA</b>	<b>MÁXIMA</b>
<b>Acidez Volátil (em Ácido acético)</b>	-	0,150
<b>Ésteres (em Acetato de Etila)</b>	-	0,200
<b>Aldeídos (em Acetaldeído)</b>	-	0,030
<b>Furfural</b>	-	0,005
<b>Álcoois Superiores (em Álcool iso-amílico)</b>	-	0,300
<b>Voláteis Totais (*)</b>	0,200	0,650

**AA – Álcool Absoluto (100%, v/v)**

**(\*) Soma de aldeídos, ácidos voláteis, ésteres, furfural e álcoois superiores.**

Fonte: BRASIL, 1997.

Apesar dos congêneres surgirem em todos os momentos da fabricação da cachaça, com alguns podendo estar inicialmente presentes no destilado, são os originados durante o processo de envelhecimento, por extração da madeira pela cachaça ou como produtos de reações químicas ocorridas durante a sua guarda, que estão mais estreitamente ligados aos atributos sensoriais desejados para uma aguardente de qualidade. Processo este que é caracterizado por mudanças na cor, na composição e na concentração dos congêneres, no declínio do volume e no teor alcoólico da mesma, acarretando melhoramentos no sabor e no aroma da bebida maturada (QUESADA *et al.*, 1999); MOSEDALE; PUECH, 1998; DIAS; MAIA; NELSON, 1998; BOZA; OETTERER, 1999; CAMPOS, 2000;), podem ser causadas pelos seguintes fatores:

- Extração direta dos compostos da madeira;
- Decomposição das macromoléculas da madeira dos tonéis e a subsequente extração dos produtos desta decomposição pelo destilado;
- Reações entre os componentes da madeira e os componentes do destilado bruto;
- Reações envolvendo apenas os componentes extraídos da madeira;
- Reações envolvendo apenas os componentes da cachaça;
- Evaporação dos compostos voláteis.

Na prática, estas reações ocorrem simultaneamente e o tempo requerido para que estas mudanças transcorram de forma satisfatória, varia em função da condição inicial da bebida, do tamanho do recipiente, da espécie da madeira e do seu respectivo tratamento e das condições ambientais do local em que se encontra o barril (REAZIN, 1981; NISHIMURA & MATSUYAMA, 1989; CAMPOS, 2000).

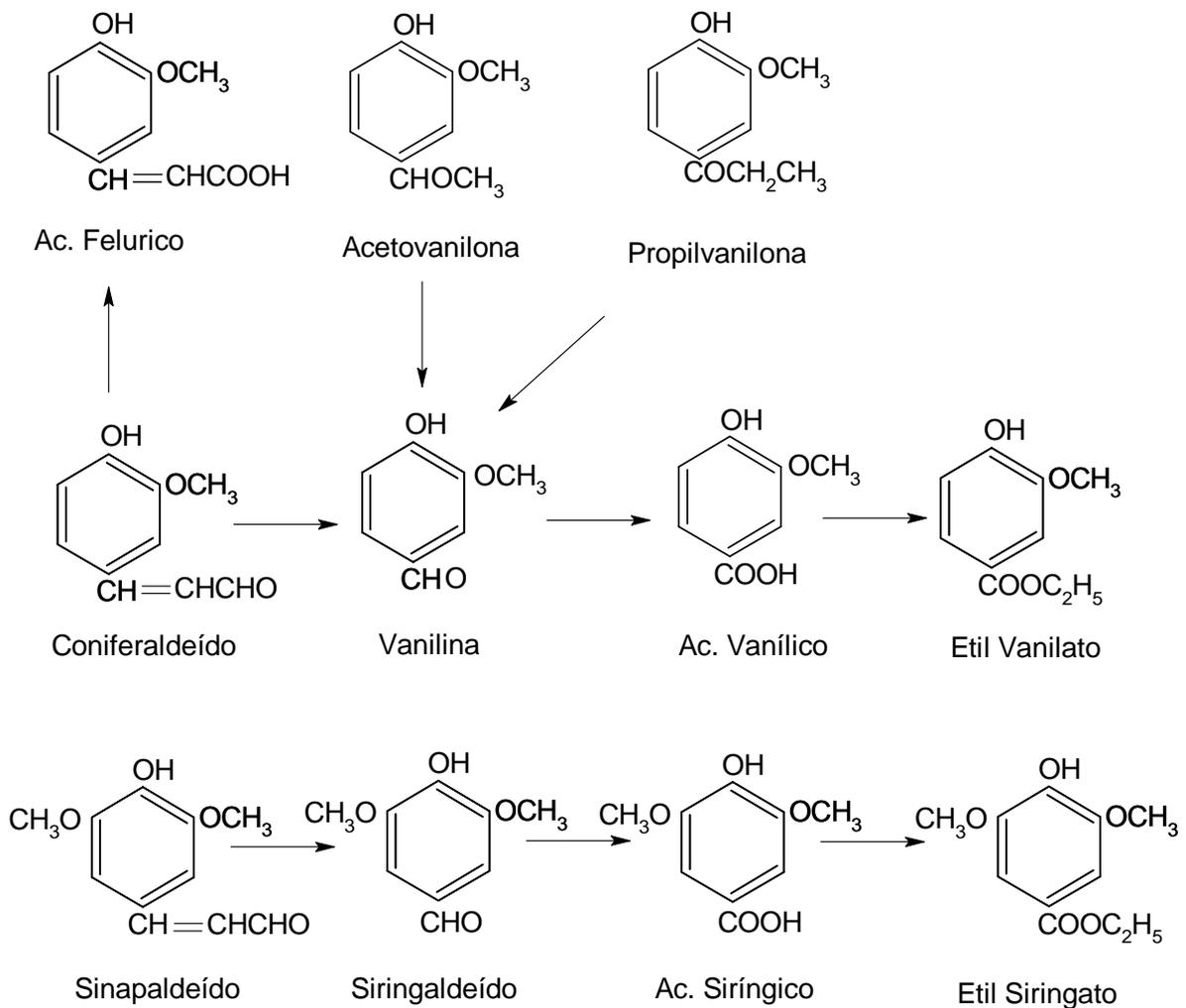
Dos componentes majoritários da madeira (Celulose, Hemicelulose e Lignina) a lignina é o que mais contribui para a gênese de congêneres, que inicialmente em sua maioria são compostos fenólicos e taninos, podendo constituir até 40% do teor do extrato seco da cachaça, o que ocorre graças às numerosas reações de degradação localizadas nas paredes dos barris, desencadeadas pela passagem do álcool e da água por penetração capilar e

osmose através das fissuras e células da parede interna da madeira, iniciando a hidrólise da hemicelulose e da lignina (PUECH; GOFFINET, 1987).

Quanto à celulose, esta não sofre reações de degradação pelo álcool, entretanto evidências levam a crer que furanos e piranos substituídos, encontrados em destilados maturados, como o furfural, o hidroximetilfurfural e o furfural álcool, podem ter uma de suas origens na desidratação térmica de açúcares, formados desta maneira por termólise da celulose durante a fabricação dos barris (SINGLETON, 1995; BARROSO *et al.* 1996; CUTZACH *et al.* 1999).

Entre os vários compostos fenólicos já identificados na cachaça e em outros destilados envelhecidos, destacam-se coniferaldeído, sinapaldeído, siringaldeído e a vanilina que, extraídos por etanólise, convertem-se num segundo momento em ésteres, contribuindo de forma intensa para o aperfeiçoamento do buquê da cachaça (REAZIN, 1981; NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989; BETTIN *et al.*; ESCALONA *et al.*, 2002).

- 1a) Madeira - Lignina<sub>x</sub> + Etanol  $\longrightarrow$  Álcool Coniferílico + Álcool Sinapílico
- 1b) Madeira - Lignina<sub>x</sub> + Etanol  $\longrightarrow$  Lignina<sub>(x-n)</sub> + n(Lignina-Etanol)
- 2) Lignina - Etanol  $\longrightarrow$  Etanol + Álcool Coniferílico + Álcool Sinapílico
- 3a) Álcool Sinapílico + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Sinapaldeído
- 3b) Álcool Coniferílico + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Coniferaldeído
- 4a) Sinapaldeído + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Siringaldeído
- 4b) Coniferaldeído + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Vanilina



**FIGURA 5** – Mecanismos simplificados de formação de compostos fenólicos de baixo peso molecular e ésteres a partir da madeira.

Fonte: Adaptado de REAZIN, 1981 e NISHIMURA; MATSUYAMA, 1989.

Com base no que já é conhecido da dinâmica de extração de compostos da madeira, as dimensões dos tonéis, e conseqüentemente as suas relações de área/volume e o grau de porosidade desta, despontam como importantes fatores para o envelhecimento dos destilados.

Reservatórios pequenos potencializam a evaporação do destilado, promovem elevações no gradiente de extração dos constituintes da madeira e ainda uma maior troca de oxigênio com o ambiente, alavancando o número de reações de oxidação, resultando em desequilíbrio nas características sensoriais da bebida, sendo necessário então uma redução no tempo de envelhecimento. Num outro extremo, grandes reservatórios reduzem as trocas de oxigênio e reduzem a taxa de extração de componentes da madeira. Desta forma, barris com dimensões em que a relação entre volume e a sua área em contato com o destilado relativamente proporcional são os mais empregados, pois são favoráveis a uma menor taxa de evaporação do etanol, dos demais componentes voláteis do destilado e a um fluxo satisfatório a gradual de compostos da madeira para a bebida (SALGADO *et al.*, 1996; CUTZACH; CHATONNET; DUBOURDIEU, 1999; CHATONNET *et al.*, 1999; PÉREZ-PRIETO, *et al.*, 2002).

## **2.6. ASPECTOS SENSORIAIS E FÍSICO-QUÍMICOS DA CACHAÇA ENVELHECIDA**

Em trabalho realizado por CARDELLO & FARIA (2000) foi avaliada a aceitação de cachaças envelhecidas e não envelhecidas. Evidenciou-se que amostras envelhecidas por períodos superiores a 24 meses em tonel de carvalho obtiveram a preferência dos consumidores em relação a amostras comerciais não envelhecidas e até envelhecidas as quais podem ser cortadas com a subsequente correção de sua cor. Outros pesquisadores relatam taxas crescentes de aceitação para atributos como cor, aroma, sabor e impressão global ao longo do decorrer da maturação da cachaça, ao passo que descritores como aroma alcoólico, agressividade, sabor inicial e residual de álcool, figuraram em níveis significativamente inferiores aos relatados para amostras não envelhecidas

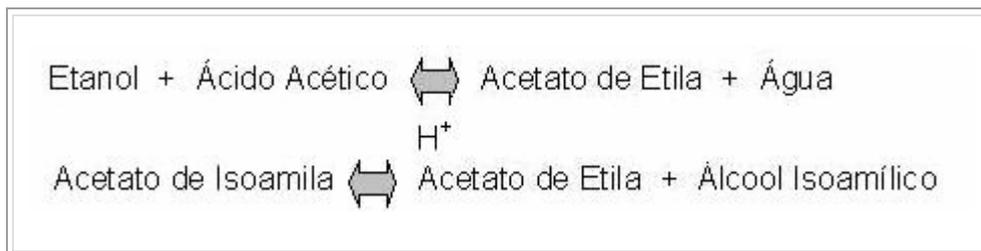
(FURTADO, 1994; BOSCOLO, 1996, CARDELLO; FARIA 1998; DIAS; MAIA; NELSON, 1998; PINHEIRO, 1999).

Ao longo do envelhecimento elevam-se o índice de cor, o teor de sólidos totais constituído pelo material não volátil e compostos inorgânicos, as concentrações de taninos, ésteres, aldeídos e ainda a acidez total, formada pela soma da acidez fixa e volátil, também sofrem incrementos com o passar do tempo, porém com intensidades diferentes para cada um destes parâmetros (NISHIMURA & MATSUYAMA, 1989).

Em um dos primeiros trabalhos sobre envelhecimento da cachaça realizados no Brasil, ALMEIDA *et al.* (1947) concluíram que ao longo do envelhecimento de aguardentes de cana, apesar da concentração de aldeídos aumentar, este aumento não ocorre de modo proporcional ao tempo de guarda. Posteriormente, BOSCOLO (1996) por meio de métodos instrumentais mais refinados confirmou a elevação do teor dos aldeídos, porém determinou que apenas o formaldeído e o acetaldeído demonstraram acréscimos constantes com o tempo, enquanto que no mesmo período ocorreu uma redução no teor da acroleína.

As aguardentes velhas exibem uma elevação natural da acidez, devido especialmente ao aumento da concentração de ácido acético, que por sua vez é oriundo da oxidação do etanol e da extração a partir da madeira (ALMEIDA *et al.*, 1947; EGORROV; RODOPULO, 1994).

O aroma agradável da cachaça velha é em grande parte conseqüência da formação de ésteres, originados por um sistema dinâmico, influenciado por mudanças nas concentrações de ácido acético, etanol e água. De modo que a perda de água por evaporação e/ou aumento da concentração de ácido acético durante a maturação resulta num aumento da concentração acetato de etila (REAZIN *et al.*, 1976), que é o principal éster presente não só na cachaça, mas em todas as bebidas envelhecidas. Entretanto, outros ésteres estão presentes devido à extensão de reações de esterificação e transesterificação, cujos equilíbrios se estabelecem em função da concentração dos diferentes álcoois e ácidos presentes na bebida, bem como do pH da mesma. Desta forma autores, como ONISHI, GUYMON e CROWELL (1977), demonstraram estes mecanismos em seus trabalhos, como ilustrado na figura 6.



**FIGURA 6** – Reações de esterificação e transesterificação ocorridas ao longo do envelhecimento.

Fonte: ONISHI, GUYMON e CROWELL, 1977.

Com relação aos álcoois superiores, não ocorre alteração significativa durante o envelhecimento de uma bebida, ocorrendo apenas ligeira variação em consequência principalmente da diminuição do teor alcoólico.

## **2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAIXO PESO MOLECULAR PRESENTES EM DESTILADOS ENVELHECIDOS.**

Estudos realizados com destilados de alta qualidade apontam o envelhecimento como essencial para que tais bebidas atinjam esta condição, devido a numerosas alterações no perfil dos congêneres ocorridos ao longo deste período. Os congêneres que propiciam melhoria nos aspectos sensoriais englobam ácidos, aldeídos, taninos entre outros compostos, e são normalmente designados como compostos fenólicos de baixo peso molecular (BOZHINOV, 1994; MANGAS; RODRIGUEZ; MORENO, 1996). Alguns destes compostos são adotados como “Marcadores” ou “Padrões de Envelhecimento”, pois através do acompanhamento nas modificações qualitativas e quantitativas dos mesmos é possível estimar o tempo de envelhecimento de destilados (LO COCO *et al.*1995; MANGAS; RODRIGUEZ; MORENO, 1996; JAGANATHAN; DUGAR, 1999), uma vez que a formação da maioria destes compostos se baseia na degradação da lignina pela etanolise oxidativa, em presença de oxigênio molecular durante a estocagem da bebida em tonéis. Geralmente, a vanilina e o coniferaldeído são obtidos, em maior quantidade, da lignina oriunda de madeiras macias, enquanto siringaldeído e sinapaldeído resultam de ligninas de madeiras duras.

De modo geral, o siringaldeído e a vanilina são os aldeídos predominantes em bebidas alcoólicas envelhecidas, mas também são encontrados compostos como o ácido siríngico, sinápico, vanílico e ferúlico e ainda seus respectivos ésteres (YOKOYA, 1995).

Recentemente, GOLDBERG e colaboradores (1999) abordaram um importante aspecto dos constituintes fenólicos de baixo peso molecular presentes em bebidas envelhecidas, ressaltando as atividades antioxidantes, sequestradora de radicais livres, anticarcinogênicas, antiinflamatórias.

Além de aldeídos e ácidos, as cumarinas, compostos caracterizados pela presença de um anel aromático fixado a um anel lactona condensado, são substâncias presentes em largas quantidades no reino vegetal que passaram a ser observadas por pesquisadores ligados ao controle e a melhoria dos destilados, visto que em bebidas alcoólicas a presença destes compostos pode estar ligada ao contato do mesmo por períodos prolongados com a madeira do seu recipiente de guarda (SALAGOITYAUGUSTE; TRICARD; SUDRAUD, 1987; VIVAS; BOUGEOIS; VITRY, 1998; CANAS *et al.*, 1999; LAKE, 1999; IZQUIERDO *et al.* 2000). Cumarinas como esculina, umbeliferona, escopoletina, 4-metil-umbeliferona e a cumarina (1,2-benzopirona), são as mais investigadas como marcadores e, em particular, a cumarina propriamente dita, é usada como agente de fixação e potencializador de características sensoriais em vários produtos como perfumes, pastas de dentes, produtos com tabaco e em bebidas alcoólicas (LAKE, 1999).

Entretanto, a cumarina sempre esteve, e permanece no centro de discussões científicas, devido as suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, como, por exemplo, ser um potente anticoagulante. Mas, ao mesmo tempo, é suspeita de que em elevadas doses poder induzir o surgimento de carcinomas hepáticos. Todavia, esta suspeita ainda não foi comprovada de forma absoluta. Somente no último pronunciamento do comitê científico para alimentos da comissão européia, 45 estudos científicos realizados entre 1994 e 1998 foram avaliados e não foi possível a emissão de um parecer atestando o caráter carcinogênico da cumarina. Desta forma o mesmo comitê determinou a permanência do limite para a cumarina em 10mg/L para bebidas alcoólicas (EUROPEAN COMMISSION, 1999).

## 2.8. O ENVELHECIMENTO DE BEBIDAS NO MUNDO E EM CACHAÇA NO BRASIL

Em países, como Escócia, França, Itália, Estados Unidos e Austrália, o envelhecimento é um tema de muito estudo, com os resultados obtidos sendo aplicados por produtores, elevando desta forma a qualidade e o preço de cada bebida produzida. Nos Estados Unidos, o uísque de milho é maturado somente em barris novos. No Canadá e na Escócia o uísque é obrigatoriamente envelhecido por um mínimo de três anos e muitos “puro malte” por períodos de 12 anos ou mais (MOSEDALE; PUECH, 1998). Na Europa, pesquisas são conduzidas visando definir os compostos responsáveis pelas peculiaridades das bebidas envelhecidas típicas de vários países (PIGGOTT; HUNTER; MARGOMENOU, 2000; MORENO; BARROSO, 2002; CERDÁN; MOZAZ; AZPILICUETA, 2002).

Trabalhos também são realizados objetivando desenvolver técnicas capazes de promover o envelhecimento de modo satisfatório e reprodutivo em períodos reduzidos, como a adição de madeiras nos tonéis, realização de “blends”; adição de aromas artificiais ou extratos de madeira (GOS, 1990; HOOPER; MARKS, 1992; MARTINEZ *et al.*, 1996, PENSADO *et al.*, 2000).

Com relação a estas pesquisas, a adição de pedaços de madeira, apesar de promover alterações principalmente na cor, esta técnica tem uma grave desvantagem que é a falta de reprodutividade no produto obtido, pois mesmo que os pedaços adicionados possuam tamanhos e até mesmo uma superfície de contato sempre equivalente nas diversas adições, o que pode ser obtido, por exemplo, através do corte da madeira em cubos de lados iguais, fatores como o porte físico da árvore, a sua espécie e as condições climáticas a que esta foi submetida, além das características da própria bebida entre as quais o seu teor alcoólico e acidez, além de outros fatores como a taxa de evaporação e o índice de troca de oxigênio através do barril tornam esta técnica por demais imprecisa para uso em larga escala (MARTINEZ *et al.*, 1996; SALGADO *et al.*, 1996).

Por outro lado, a realização do “blend” ou misturas entre bebidas envelhecidas e bebidas recém obtidas é um procedimento tradicionalmente empregado por tradicionais produtores de várias regiões do mundo, chegando

inclusive a ser um diferencial entre uma ou outra marca de destilado. Esta operação é a única empregada em escala industrial e descrita oficialmente para a cachaça brasileira, o que é feito inclusive com a adição de açúcar e caramelo. Isto resulta em graves problemas para a nossa cachaça que contribuem na condução incorreta dos cortes, no atesto dos tonéis mais antigos provocando alterações no padrão e no tempo de envelhecimento, o que ainda é piorado pela capacidade excessivamente elevada dos tonéis utilizados que variam de 2.000 a 50.000 litros, diminuindo a relação área de contato/volume (BRASIL, 1997; CAMPOS, 2000; BRASIL, 2002).

Os extratos de madeira são uma possibilidade de aceleração no envelhecimento defendida por pesquisadores como BREGVADZE (1991) e BOZHINOV (1994) e de forma pioneira no Ceará por CAMPOS (2000), em que na maior parte das vezes tem-se a adição de soluções que contêm compostos bonificadores como a vanilina e outros compostos fenólicos de baixo peso molecular, obtidos por meio de maceração, arraste a vapor, infusão ou refluxo da madeira (previamente tratada), na maior parte das ocasiões com a própria cachaça ou com soluções etanólicas. É importante salientar que esta técnica de envelhecimento não visa à substituição integral do tempo de guarda da bebida, pois sempre será necessário que a bebida fique em repouso por período suficiente para que as interações entre os componentes da bebida e do extrato, resultem no aroma e sabor característico do destilado envelhecido.

Assim, quer seja pela disputa por novos mercados, rompimento de preconceitos, melhoria da qualidade ou simplesmente aumento nos ganhos financeiros, é necessário que os produtores brasileiros de cachaça conscientizem-se de que o envelhecimento, além de indispensável é a garantia de que estes objetivos sejam atingidos.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Delineamento do experimento

O presente trabalho constituiu-se de três etapas que foram totalmente executadas nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Agenor Maia Ferreira (LABIOTEC), do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFC, na seguinte ordem: Desenvolvimento e validação da metodologia analítica via cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, elaboração e análise dos extratos de Amburana e análise das cachaças cearenses envelhecidas.

A etapa de desenvolvimento e validação do método buscou cumprir os requisitos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez segundo os padrões estipulados por BOGAN; O'KENNEDY (1996) LEITE (1996), RILEY; ROSANKE, (1996) e BREDOLAN (2000), para os compostos: Ácido Gálico, 5-hidroximetilfurfural, Furfural, Ácido Vanílico, Ácido Siringico, Vanilina, Siringaldeído, Coniferaldeído, Sinapaldeído e Cumarina.

Na elaboração dos extratos, foram inicialmente usadas: Amburana (*Amburana cearensis*), carvalho (*Quercus Alba* L.) e bálsamo (*Myroxylon. peruiferum*) em cubos, de 1,0 cm<sup>3</sup> de lado, com o intuito de verificar o comportamento da Amburana perante o carvalho (usada como madeira de referência) e o bálsamo (amplamente usada em tonéis no Ceará), após o tratamento térmico, usualmente descrito na literatura (PHILP, 1989; BELCHIOR *et al.*, 1996; MOSEDALE & FORD, 1996; CANAS *et al.*, 2000, CAMPOS, 2000), no que se refere a suas potencialidades como fonte de compostos fenólicos de baixo peso molecular, para adição em cachaça, a fim de potencializar os seus atributos de qualidade após o envelhecimento.

Num segundo momento, buscou-se maximizar a concentração de compostos fenólicos obtidos do extrato de Amburana por meio de variações no procedimento de extração.

Por fim foram analisadas amostras de cachaças envelhecidas das regiões produtoras cearenses, para que fosse traçado um perfil destes compostos nas cachaças do nosso Estado.

## **3.2. MATERIAL**

### **3.2.1. Matéria-Prima**

Todas as madeiras e cachaças usadas no trabalho pertencem ao acervo do LABIOTEC (PINHEIRO, 1999).

A autenticidade do envelhecimento das cachaças foi comprovada, pois as amostras foram adquiridas por membros do Laboratório juntos aos próprios produtores localizados nas cidades de Barbalha (Antônio Carneiro Garcia, Destilaria Estrela do Cariri), Crato (Fazendas Gomes de Matos Ltda., Agro. Com. Ind. Bezerra Ltda., Brigadeira Ind. de Bebidas Ltda., Engenho Bebida Nova), Jardim (Francisco Barreto Novaes), Viçosa do Ceará (Alfredo Carneiro de Miranda, Lúcia Oliveira de Carvalho), Tianguá (Francisco Edílson dos Santos, Benedito Viera de Carvalho), Ubajara (Carlos Elpídio Pereira), Guaraciaba do Norte (Wilson Carneiro Mesquita), Acarape (Acarape Agro. Ind. Ltda.), Redenção (Exploração Agrícola Ltda.), Aratuba (Agro. Ind. Pindoba Ltda.), Palmácia (Destilaria Trinca de Três), Maranguape (A. Targino & Filhos Ltda.), Aquiraz (A. Targino & Filhos Ltda.) e Paraipaba (Ypióca Agroindustrial Ltda.).

### **3.2.2. Padrões de envelhecimento**

#### **3.2.2.1. Cachaças**

Foram empregadas para efeito comparativo amostras das seguintes cachaças:

- Uma cachaça mineira comercial envelhecida, comercializada em todo Brasil, por uma grande rede de supermercados;
- Uma cachaça pernambucana comercial envelhecida de grande vendagem;
- Uma amostra “top de linha” envelhecida do maior fabricante e exportador do Estado do Ceará.

#### **3.2.2.2. Padrões cromatográficos**

Os padrões dos compostos fenólicos de baixo peso molecular: Ácido Gálico, 5-hidroximetilfurfural, Furfural, Ácido Vanílico, Ácido Siríngico, Vanilina, Siringaldeído, Coniferaldeído, Sinapaldeído e Cumarina com pureza > 99% foram

obtidos das companhias Sigma-Aldrich (St. Louis, MO - EUA) e Acros Organics (New Jersey, EUA).

Os compostos 5-hidroximetilfurfural e Furfural, embora não sendo originados da degradação da lignina ou da hemicelulose, foram incluídos no estudo por estarem associados à degradação térmica de pentoses e hexoses respectivamente, as quais são os açúcares majoritários nos mostos de whiskys e cachaças, e ainda com o envelhecimento destas bebidas (BOZA; OETTERER, 1999; JAGANATHAN; DUGAR, 1999; QUESADA *et al.*, 1999).

### **3.2.3. Reagentes**

Na composição da fase móvel foi empregado metanol, grau de pureza cromatográfico, da Tedia Company Inc. (Fairfield, OH - EUA), água ultrapura obtida por sistema de osmose reversa e filtrada em membranas de ultrafiltração de 0,45µm, da Fresenius Kabi Brasil (Aquiraz, CE - BR) e ácido acético PA. Merck (Darmstadt, GER).

### **3.2.4. Equipamentos**

#### **3.2.4.1. Equipamentos usados na elaboração dos extratos**

- Estufa aquecedora, com circulação de ar forçada, Marconi MA 035;
- Bloco aquecedor, Marconi MA 188;
- Moinho, Fritsch Pulverisette 14;
- Banho ultrasônico Unique, modelo USC1450, com frequência ultra sônica de 25 kHz e potencia de 150 Watts;
- Forno de microondas doméstico, CCE, com potencia de 800 Watts e frequência de 2,45 GHz;
- pH-metro, Marconi MA 002;
- Centrifuga, Sigma 6-15, 5100rpm.

#### **3.2.4.2. Instrumental analítico**

Todas as análises foram efetuadas em um sistema cromatográfico de alta eficiência Varian<sup>®</sup>, gerenciado pelo software de controle e aquisição de dados Star

WS versão 5.5, e composto por duas bombas de alta pressão Pro Star 210; um forno para coluna modelo Timbeline 101; um detector UV-Vis Pro Star de duplo canal, com variação programável de comprimento de onda durante as análises, modelo 345 e injetor Rheodyne com loop de 20 $\mu$ L.

Os componentes das amostras e padrões foram separadas por uma coluna Merck LiChrospher 100 RP-18 endcapped, de 250mm x 4mm (comprimento x diâmetro interno) empacotada com partículas totalmente esféricas de 5 $\mu$ m.

Antes de serem cromatografadas as amostras e padrões foram filtrados em um sistema Hamilton aclopável a seringas, composto por um pré-filtro de microfibras de borosilicato e por uma membrana filtrante de nylon com abertura de 0,45 $\mu$ m, ambos com 0,14cm de diâmetro.

### **3.3. MÉTODOS**

#### **3.3.1. Validação metodológica**

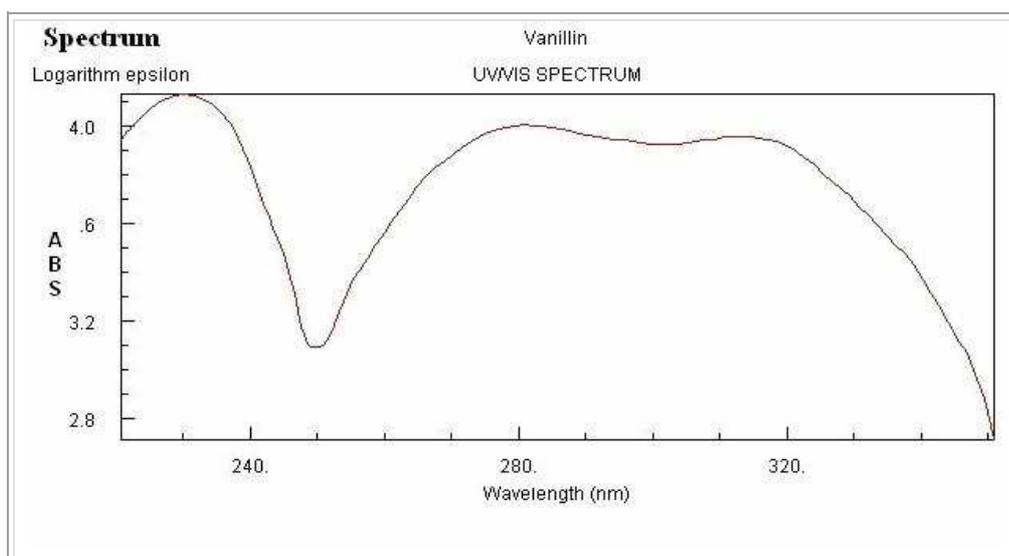
O início da validação analítica ocorreu com a injeção individual de 10 ppm (diluídos em Água – Ácido Acético, 1:1) de todos os padrões cromatográficos, os quais foram eluídos por uma fase móvel isocrática composta pela mistura dos solventes A e B na proporção de 80:20 onde o solvente A era composto por Água : Ácido Acético, 98:2 (v/v) e o solvente B por Metanol : Água : Ácido Acético, 70:28:2 (v/v), a fim de se verificar a resposta de cada composto no comprimento de onda usado no método. A definição do comprimento de onda para os compostos foi efetuada com base nos dados da literatura (**TABELA 2**), de modo que os compostos foram separados em grupos que possuem comprimentos de onda de absorção máxima próximos.

**TABELA 2** – Comprimentos de onda -  $\lambda$  (nm) de máxima absorção para cada composto e comprimento de onda usado no método validado.

COMPOSTO	COMPRIMENTO DE ONDA ( $\lambda$ , nm)	
	MÁXIMA ABS	USADO
Ácido Gálico	271	271
5-hidroxiacetilfurfural	285	280
Furfural	233, 276	
Ácido Vanílico	262, 295	
Ácido Siringico	276	
Vanilina	230, 280 – 315	
Siringaldeído	238, 309	
Cumarina	274, 320	320
Coniferaldeído	243, 306 – 342	345
Sinapaldeído	246, 347	

**ONDE:**  $\lambda$  separados pelo caractere – , referem-se a bandas de absorção máxima de energia, conforme exemplificado na **FIGURA 7**.

**Fonte:** NIST WebBook – Standard Reference Data Program.



**FIGURA 7** – Espectro UV/VIS da Vanilina.

**Fonte:** NIST WebBook – Standard Reference Data Program.

Após o conhecimento da intensidade de resposta para cada composto e o aspecto do seu pico, iniciou-se o ajuste no gradiente da fase móvel, para que fossem obtidas as melhores condições do fluxo de solvente, temperatura de termostatização da coluna, (TABELA 3), tempo de retenção, resolução dos picos e duração da corrida cromatográfica, partindo-se das condições descritas por PUECH, RABIER e MOUTOUNET (1988) e posteriormente usadas por CANAS *et al.* (2000), desenvolvidos para análises de extratos de carvalho e destilados de uva portugueses, respectivamente.

Durante os estudos para a otimização do gradiente de eluição, foram mantidas as composições dos solventes A e B. Os compostos coeluídos, depois de separados tinham a sua identidade confirmada por adição de padrão.

Nas análises dos extratos, a identidade dos analitos em estudo foi confirmada pelo tempo de retenção com uma tolerância máxima de  $\pm 5\%$ .

**TABELA 3** – Valores de fluxo, gradiente linear (nos períodos de variação da fase móvel), temperatura da fase móvel após a otimização das condições de separação.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Solvente A (%, v/v)</b>	<b>Solvente B (%, v/v)</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>	<b>Temperatura da Coluna (°C)</b>
0,00	100	0	1,25	40
3,00	100	0	1,25	40
25,00	60	40	1,25	40
43,00	40	60	1,25	40
50,00	0	100	1,25	40
55,00	100	0	1,25	40
60,00	100	0	1,25	40

**Solvente A:** Água : Ácido Acético, 98:2% (v/v).

**Solvente B:** Metanol : Água : Ácido Acético, 70:28:2% (v/v)

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

**TABELA 4** – Tempo de retenção para os compostos analisados.

<b>COMPOSTO</b>	<b><i>Tempo de Retenção (min)</i></b>
<b>Ácido Gálico</b>	4,291
<b>5-hidroximetilfurfural</b>	8,588
<b>Furfural</b>	12,646
<b>Ácido Vanílico</b>	17,225
<b>Ácido Siríngico</b>	19,763
<b>Vanilina</b>	20,823
<b>Siringaldeído</b>	22,961
<b>Coniferaldeído</b>	27,111
<b>Sinapaldeído</b>	27,853
<b>Cumarina</b>	29,988

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

Para a quantificação dos analitos empregou-se o método do padrão externo, com as curvas de calibração construídas a partir da diluição de uma solução estoque etanólica a 50% contendo 1000ppm de cada analito. O valor mínimo aceitável para os coeficientes de correlação foi  $>0,995$ , calculado por regressão cúbica pelo software de aquisição de dados.

### **3.3.2. Elaboração dos extratos pela metodologia convencional**

As madeiras, em cubos de  $1\text{cm}^3$ , foram tostadas a  $200^\circ\text{C}$  por um período de 6 horas, para a Amburana e Carvalho, e 30 minutos para o Bálsamo, em estufa com circulação de ar forçada, conforme dados da literatura e trabalhados por CAMPOS (2000), (MOSEDALE & FORD, 1996; CANAS *et al.*, 2000, CAMPOS, 2000). Como

solvente foi usada a fração coração de uma cachaça fresca, previamente neutralizada pela adição de hidróxido de cálcio, baseada na sua acidez total expressa em gramas de ácido acético por 100mL e desodorizada pela filtração em leito de carvão ativado 0,1% (m/v), que por fim teve o seu teor alcoólico ajustado para 50% (v/v), pela adição de água destilada (CAMPOS, 2000).

Nas extrações a quantidade de madeira usada (calculada com base nos cubos de madeira com lados de 1 cm), respeitou os padrões escoceses para barris de envelhecimento, em que a razão área superficial da madeira/volume de solvente é de 88,5 cm<sup>2</sup>/L (PHILP, 1989), sendo conduzidas na temperatura de ebulição do solvente (85°C) em refluxo, por 48 horas.

Com o intuito de dinamizar o processo de extração da Amburana e maximizar o seu rendimento, foram introduzidas as seguintes mudanças no seu procedimento:

- Uso da Amburana na forma de pó;
- Tratamento térmico a 150 e 200°C, por diferentes períodos;
- Tratamento térmico efetuado em forno de microondas (visando maior rapidez);
- Uso de solução etanólica a 50%, com pH ajustado para 4,5 como solvente;
- Extração em banho ultra-sônico (com o intuito de reduzir o tempo de extração e a formação do furfural e do 5-HMF devido a extração ocorrer a temperatura ambiente).

A escolha destas variações deu-se por meio da avaliação dos trabalhos de (CALDEIRA; CANAS; BELCHIOR, 1996, CANAS *et al.*, 1999, MONEDERO *et al.*, 2000, PENSADO *et al.*, 2000, CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001).

### **3.3.3. Análises das cachaças envelhecidas do Estado do Ceará.**

As análises foram efetuadas com amostras oriundas das cinco regiões produtoras do Estado, por injeção direta no sistema cromatográfico, com prévia filtração, ou quando algum dos analitos da amostra exibiu concentrações acima do limite superior da sua respectiva curva de calibração, a referida amostra foi diluída com uma solução etanólica a 50% e reinjetada.

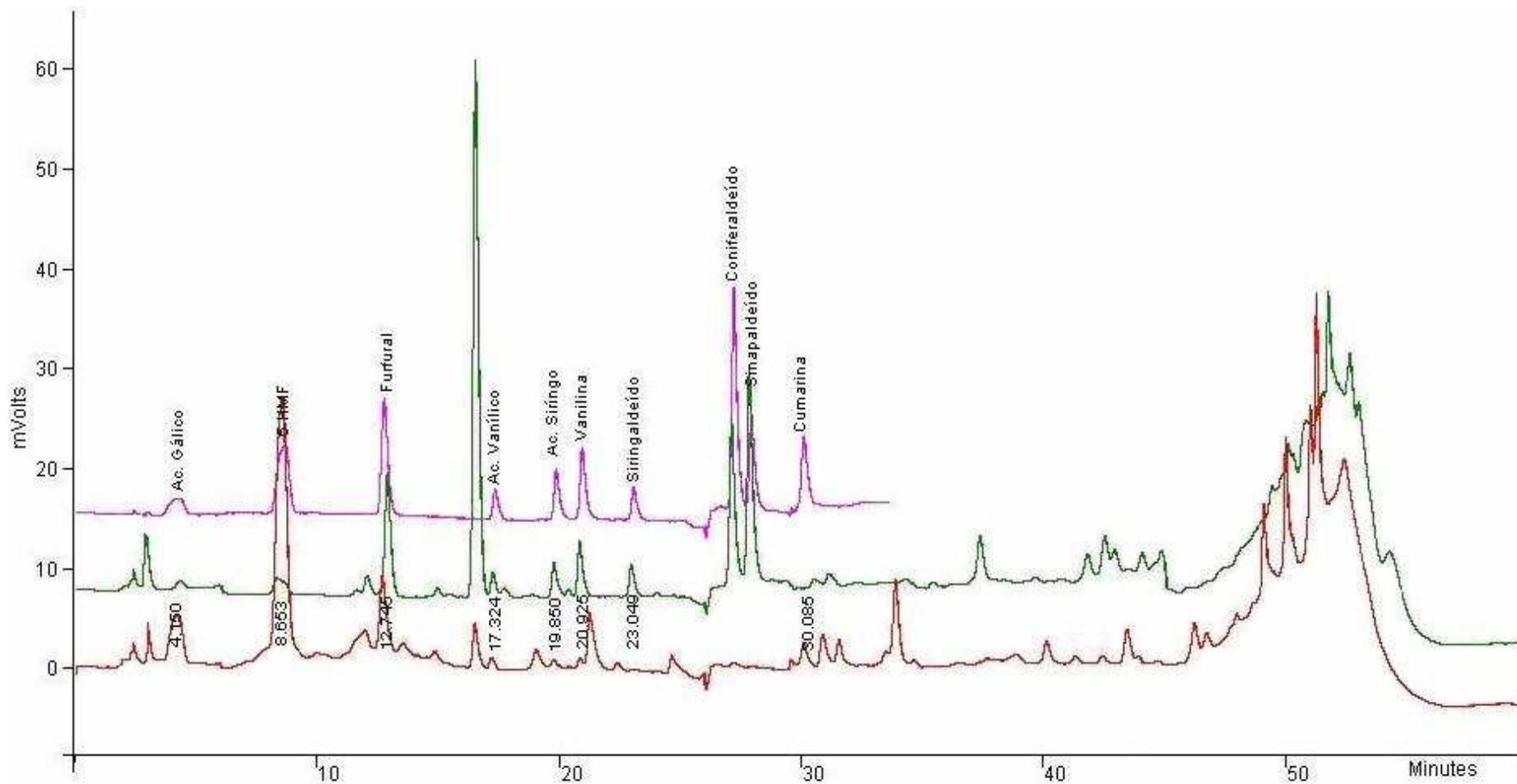
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Validação Intralaboratorial do Método

#### 4.1.1. Seletividade, Faixa de Trabalho e Linearidade

Definida por LEITE (1996), como o parâmetro que informa o quanto o método é indiferente à presença na amostra de espécies que podem interferir na determinação do analito. Para metodologias cromatográficas este parâmetro está relacionado com a largura do pico de resposta para o analito em questão.

Desta forma, trabalhadas as variantes oferecidas pela CLAE na construção do método, como o emprego de uma coluna de partículas de forma esférica e regular, sua termostatização, o gradiente da fase móvel, e as variações no comprimento durante a corrida, obteve-se cromatogramas com picos de resolução otimizada, caracterizando o método como seletivo (mas não específico) para os compostos de interesse, como pode ser visualizado na **FIGURA 8**, onde são sobrepostos os cromatogramas de um padrão (5,00 ppm), de um extrato de Amburana e de uma amostra de cachaça envelhecida, em rosa, verde e marrom, respectivamente.



**FIGURA 8** – Sobreposição de cromatogramas ressaltando a seletividade do método.

Cromatograma da misturas de 5ppm de cada padrão (linha rosa); de um extrato de Amburana tratada termicamente 200°C (linha verde) e de uma cachaça cearense envelhecida (linha marrom).

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

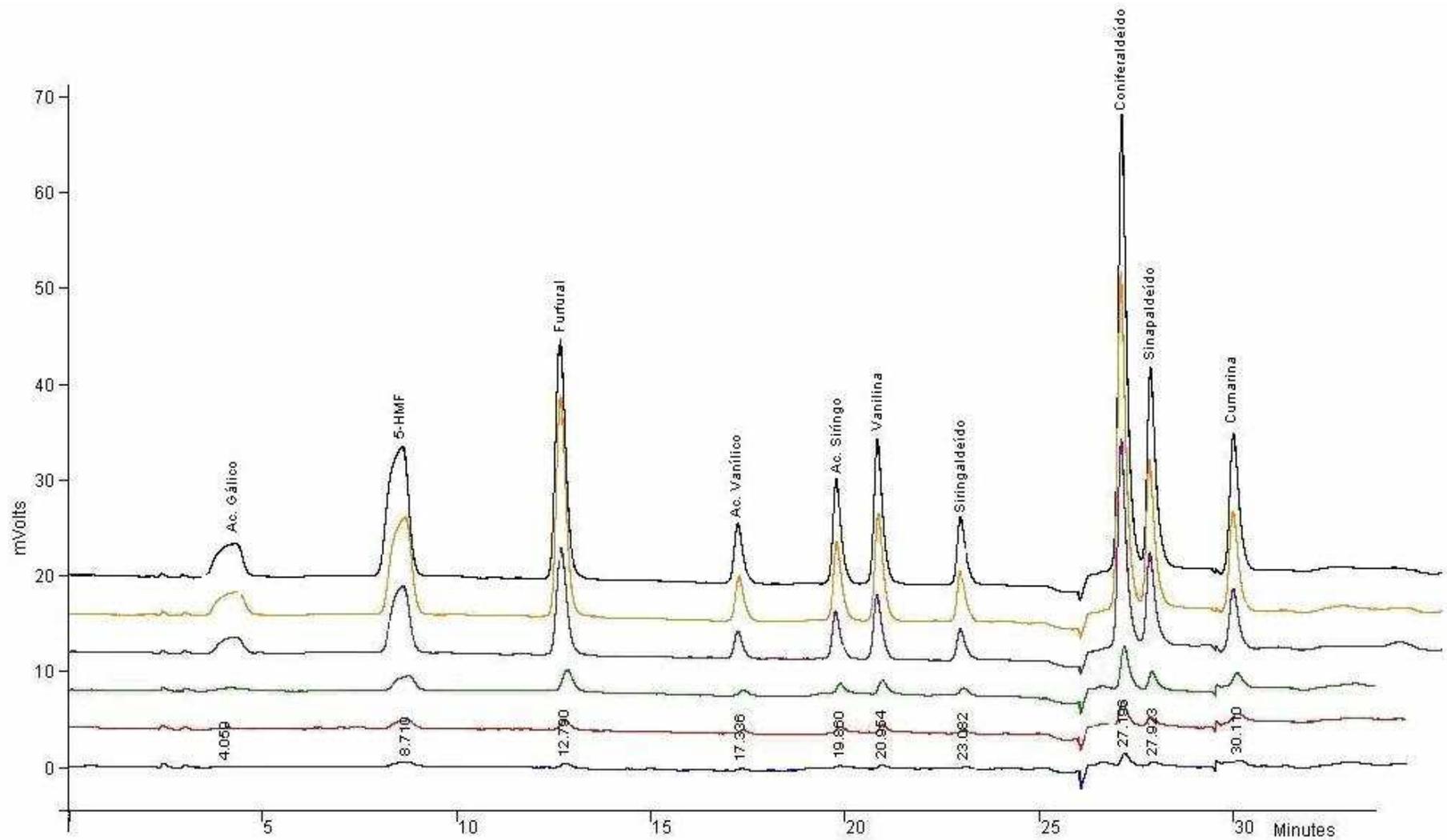
A faixa, ou “range”, de trabalho adotada para a quantificação, para todos os analitos, foi de 0,25 – 10,00ppm, exceto para o ácido gálico que foi de 0,50 – 10,00ppm. A quantificação foi efetuada pelo método do padrão externo, em que as curvas de calibração foram elaboradas por regressão cúbica, com as medias das áreas obtidas para cada analito após a injeção em triplicata de soluções etanólicas a 50% com 0,25; 0,50; 1,00; 5,00; 7,00 e 10,00ppm de todos os compostos.

Os limites de detecção foram determinados por sucessivas diluições na razão de 1:1 de uma solução padrão 10ppm, até que não mais fosse possível a obtenção de um sinal (em milivolts) no ápice do pico do analito superior a três vezes o ruído da linha de base.

Ainda com relação à linha de base, esta foi gerada (nas mesmas condições de separação dos padrões e amostras) pela injeção da solução etanólica empregada na diluição dos padrões cromatográficos, o que permitiu o registro das variações, ocasionadas pelas mudanças na composição da fase móvel e dos comprimentos de onda de detecção, que após ser gerada, passou a ser automaticamente subtraída nas corridas posteriores pelo software controlador do sistema.

As mudanças de comprimento de onda, ocorridas em intervalos de tempo a partir do início da corrida, foram programadas diretamente no detector.

Para elaboração da curva de calibração foram injetadas em triplicata, seis soluções contendo os padrões cromatográficos dos analitos (ver cromatogramas mostrados na **FIGURA 9**).



**FIGURA 9** – Sobreposição de cromatogramas da primeira das três séries de injeção dos padrões usados para confecção da curva de calibração.

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

**TABELA 5** – Equações das curvas de calibração, coeficientes de correlação (R), limites de quantificação (LQ) e limites de detecção (LD) para cada analito.

COMPOSTO	CURVA DE CALIBRAÇÃO	R	LQ (PPM)	LD (PPB)
Acido Gálico	$Y = -3.681e+001X^3 + 4.6990e+002X^2 + 1.3752e+004X - 4.4262e+002$	0.999951	0,50	120
5-HMF	$Y = -1.2523e+002X^3 + 1.1645e+003X^2 + 4.8924e+004X + 2.9486e+002$	0.999867	0,25	80
Furfural	$Y = +1.8909e+002X^3 - 1.6287e+003X^2 + 4.5194e+004X - 1.8026e+003$	0.999945	0,25	80
Ácido Vanílico	$Y = -2.1702e+001X^3 + 3.3872e+002X^2 + 9.3774e+003X + 1.4134e+003$	0.999186	0,50	120
Ácido Siríngico	$Y = +8.7784e+001X^3 - 9.1446e+002X^2 + 1.7488e+004X - 9.5861e-010$	1.000000	0,50	120
Vanilina	$Y = -1.2639e+002X^3 + 1.4525e+003X^2 + 2.2756e+004X - 3.2196e-010$	1.000000	0,25	80
Siringaldeído	$Y = -4.9432e+001X^3 + 5.3027e+002X^2 + 1.0562e+004X + 2.3210e+003$	0.999635	0,50	120
Coniferaldeído	$Y = -2.0829e+002X^3 + 2.3003e+003X^2 + 8.4060e+004X + 6.7849e+004$	0.999470	0,12	30
Sinapaldeído	$Y = +7.7217e+002X^3 - 1.3063e+004X^2 + 9.7579e+004X - 4.5547e-009$	1.000000	0,25	80
Cumarina	$Y = +1.0341e+002X^3 - 1.6258e+003X^2 + 2.7480e+004X + 2.3993e+004$	0.999928	0,25	80

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

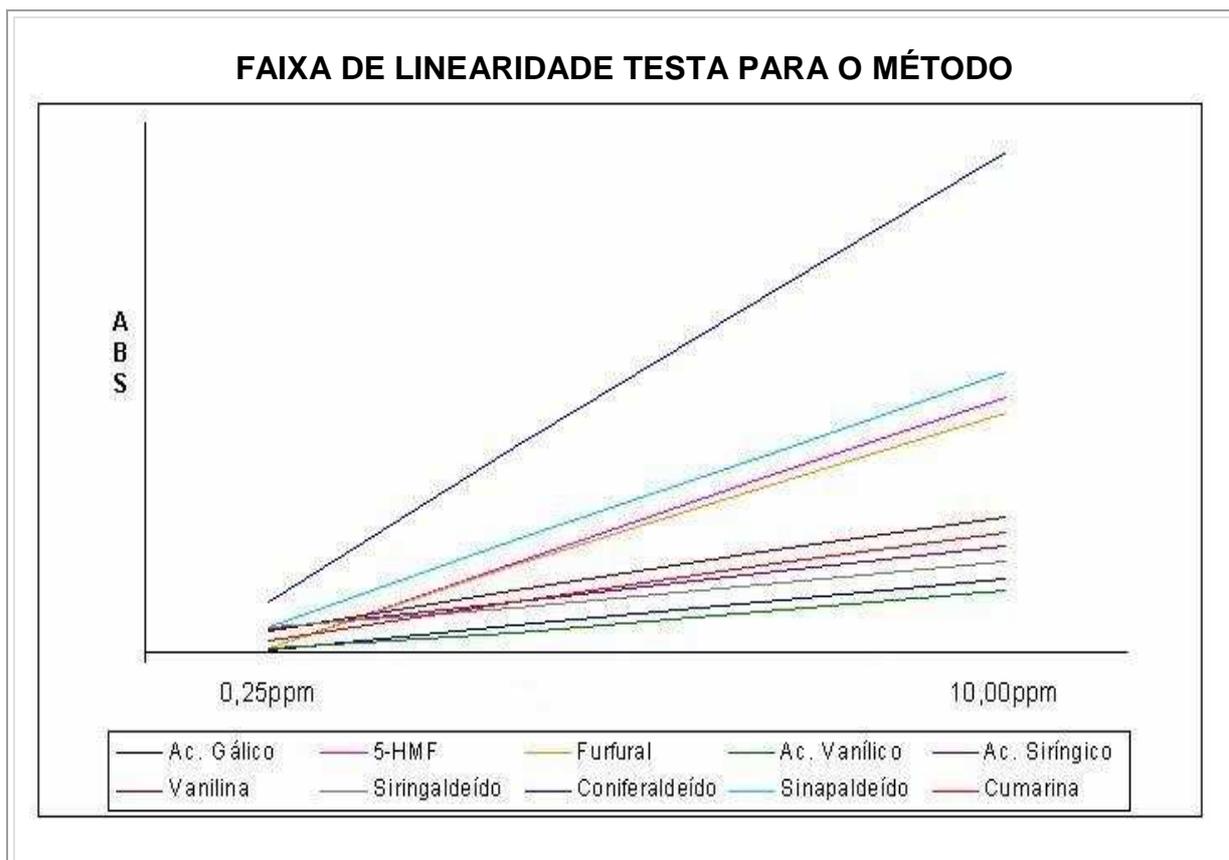
**Onde:** LQ foi calculado de maneira pratica como sendo, a concentração responsável pela produção de um sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a injeção de um branco (LEITE 1996).

Por meio das equações da **TABELA 5**, foram calculadas as áreas que, teoricamente, seriam obtidas ao se injetar no sistema cromatográfico padrões contendo 0,25; 2,50; 7,50 e 10,00 ppm dos analitos, correspondendo aproximadamente aos extremos, a  $\frac{1}{4}$  e a  $\frac{3}{4}$  do intervalo de trabalho. As médias das triplicatas foram comparadas com os valores teóricos e para nenhum dos compostos foram encontrados valores superiores a  $\pm 5\%$ . As médias das áreas obtidas foram ainda plotadas em planilha eletrônica e as retas obtidas por regressão linear apontam respostas lineares do detector para os níveis estipulados pelo método em validação.

**TABELA 6** – Relação percentual área teórica versus área real, obtidas na verificação da linearidade do método.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (ppm)			
	0,25	2,50	7,50	10,00
Ácido Gálico	- 4,72	+ 3,87	+ 3,46	+ 3,98
5-HMF	+ 1,61	- 2,12	+ 1,67	- 2,45
Furfural	+ 1,76	+ 2,82	- 2,01	- 2,27
Acido Vanílico	- 4,08	+ 3,49	+ 2,33	- 3,70
Acido Siríngico	- 3,92	- 3,17	+ 2,89	+ 3,56
Vanilina	- 2,89	- 2,07	+ 2,94	+ 3,08
Siringaldeído	+ 4,68	+ 2,50	+ 3,97	- 3,80
Coniferaldeído	+ 1,35	- 1,33	- 1,99	+ 1,07
Sinapaldeído	+ 1,38	- 2,23	- 1,08	+ 1,34
Cumarina	+ 2,63	- 3,93	+ 2,95	+ 3,25

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.



**FIGURA 10** – Resposta do detector em função da concentração do analito na faixa de trabalho do método (0,25 – 10,00ppm).  
 Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

#### 4.1.2. Estudo da precisão e exatidão do método

Para a avaliação da precisão, foram tomados os resultados de 10 injeções, seguidas de uma solução padrão contendo 5,00ppm de cada analito. Após a avaliação estatística dos dados obtidos, chegou-se a precisão do método.

A verificação da exatidão da metodologia analítica foi efetuada pela fortificação (dopagem) com padrões cromatográficos de uma amostra previamente analisada, onde o nível percentual de recuperação foi determinado pela relação  $(\text{Concentração esperada} / \text{Concentração medida}) / 100$ .

Os dados analíticos correspondentes ao estudo de precisão e exatidão do método encontram-se nas **TABELAS 7 e 8**.

**TABELA 7** – Avaliação da precisão (repetibilidade) do método: Determinação do Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV%).

COMPOSTO	X (MG/L) <sup>N</sup>	DP	CV (%)
Acido Gálico	5,04	0,35	7,01
5-HMF	5,02	0,13	2,54
Furfural	5,05	0,11	2,10
Acido Vanílico	5,01	0,19	3,81
Acido Siríngico	5,03	0,22	4,36
Vanilina	5,14	0,22	4,27
Siringaldeído	4,98	0,14	2,84
Coniferaldeído	4,95	0,11	2,14
Sinapaldeído	4,96	0,19	3,85
Cumarina	5,03	0,21	4,08

**Onde:** N = Valores médios de 10 determinações.

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

**TABELA 8** – Avaliação da precisão do método: Cálculo da Recuperação (%).

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (ppm)			RECUPERAÇÃO (%)
	AMOSTRA	ADICIONADO	ENCONTRADO	
Acido Gálico	1,27	5,00	6,09	97,13
5-HMF	1,04	5,00	6,12	101,32
Furfural	7,12	5,00	11,97	98,76
Acido Vanílico	2,71	5,00	7,56	98,05
Acido Siríngico	3,67	5,00	8,45	97,46
Vanilina	3,53	5,00	8,38	98,24
Siringaldeído	8,18	5,00	13,41	101,74
Coniferaldeído	3,55	5,00	8,50	99,41
Sinapaldeído	9,03	5,00	14,27	101,71
Cumarina	0,47	5,00	5,62	102,74

Fonte: Dados experimentais da pesquisa.

Com base nos dados das **TABELAS 7 e 8**, fica demonstrado que o método exibe atributos de precisão e exatidão em níveis aceitáveis, o que em conjunto com os demais parâmetros avaliados de forma satisfatória, garantem a confiabilidade das análises deste trabalho e de trabalhos futuros que lancem mão da presente metodologia.

## **4.2. Análises dos extratos**

### **4.2.1 Avaliação do potencial da Amburana como fonte de compostos fenólicos em relação ao Carvalho e ao Bálsamo.**

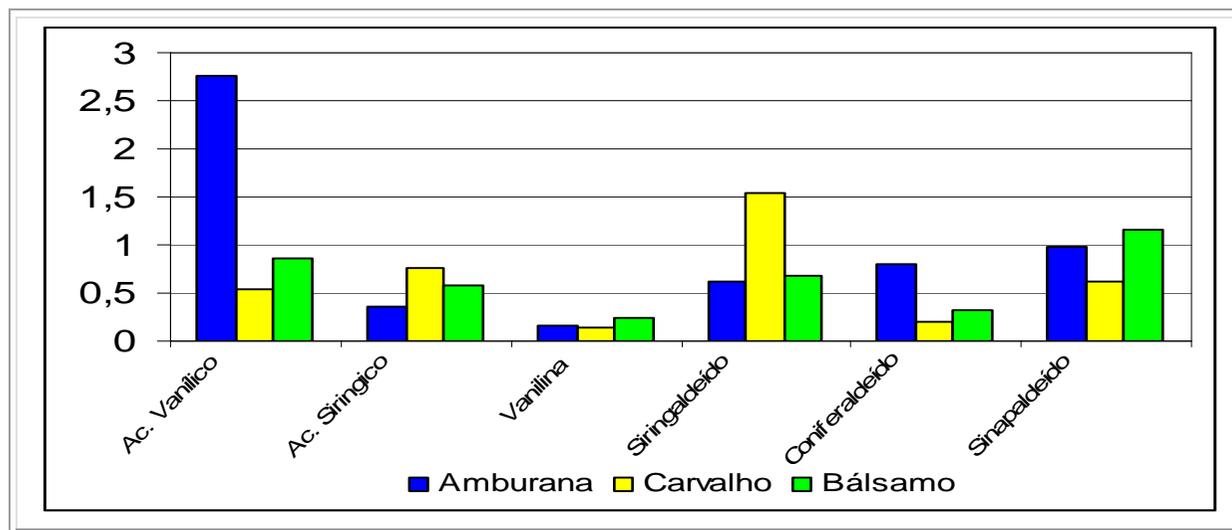
Em concordância com os padrões escoceses (PHILP, 1989), 37 cubos com lados de 1,0cm (após tratamento térmico), de cada madeira em teste, foram adicionados nos balões de refluxo que continham 250mL do solvente, a fim de se cumprir à relação área/volume do barril de aproximadamente 88,5cm<sup>2</sup>/L.

Os experimentos foram efetuados em triplicata, conforme descrito no item 3.3.2, e as massas resultantes dos 37 cubos para cada amostra encontraram-se entre 55 e 67g, de forma que as variações de massa podem ser creditadas às diferentes densidades das madeiras.

Os resultados analíticos obtidos encontram-se na **TABELA 9**.

**TABELA 9** – Concentração (ppm) dos compostos fenólicos obtidos nos extratos após o tratamento térmico de Amburana, Carvalho e Bálamo.

MADEIRA	Ácido Vanílico	Ácido Siríngico	Vanilina	Siringaldeído	Coniferaldeído	Sinapaldeído	Total
<b>Amburana</b>	2,7528 ± 0,040	0,3551 ± 0,012	0,1628 ± 0,001	0,6298 ± 0,020	0,7912 ± 0,041	0,9750 ± 0,012	5,6667 ± 0,127
<b>Carvalho</b>	0,5473 ± 0,050	0,7657 ± 0,041	0,1490 ± 0,016	1,5386 ± 0,020	0,1908 ± 0,008	0,6296 ± 0,002	3,8210 ± 0,137
<b>Bálamo</b>	0,8601 ± 0,019	0,5888 ± 0,014	0,244 ± 0,006	0,6872 ± 0,010	0,3257 ± 0,006	1,1653 ± 0,013	3,8713 ± 0,068



**FIGURA 11** – Proporções entre os compostos fenólicos analisados para cada madeira.

Com exceção do alto teor de ácido vanílico na Amburana (desejável pela sua contribuição para o buquê da bebida), a FIGURA 11 nos permite observar claramente um perfil quantitativo equivalente entre a Amburana, o carvalho e o bálsamo para todos os compostos analisados.

Ainda com relação aos os dados obtidos, estes se apresentaram em concordância com os resultados do trabalho de DIAS; MAIA; NELSON (1998) que teve como objeto de estudo cachaças envelhecidas em tonéis de diferentes madeiras, e que reportou a predominância do ácido vanílico e do sinapaldeído em relação aos demais compostos fenólicos presentes na bebida.

Um outro ponto que se destaca ao confrontarmos estes trabalhos é que a razão ácido vanílico/sinapaldeído manteve-se em patamares próximos em ambos os trabalhos: 2,823 no presente estudo e 2,013 no trabalho de DIAS; MAIA; NELSON (1998), o que se confirmado como um valor de tendência por novas investigações em cachaças e extratos, pode vir a se tornar uma ferramenta que somada a outras podem elucidar questões sobre o envelhecimento o verdadeiro ou não envelhecimento de uma cachaça em tonéis de Amburana.

Assim, estes dados respaldam o avanço nos estudos dos extratos de Amburana no intuito de maximizar o seu rendimento, e também verificar o comportamento da cumarina (potencial indicador de envelhecimento) nestes extratos, tendo em vista as controversas opiniões sobre a sua inocuidade, ou não, para a saúde humana.

#### **4.2.2. Otimização do processo de obtenção do extrato de Amburana.**

Para a obtenção de um maior rendimento nos extratos, decidiu-se usar a Amburana na forma de pó, visto que o aumento nas relações área da madeira x superfície de exposição ao tratamento térmico e área x superfície de contato direto com o solvente seria bem mais favorável ao rendimento do processo de extração. Desta forma, raspas de Amburana dos pedaços que originaram os cubos empregados na experiência anterior, foram pulverizadas por meio de um moinho de facas.

O próximo ponto em questão foi a determinação da temperatura a que seriam submetidas às amostras. Para tanto se empregou como referência as faixas descritas no trabalho de CHATONNET *et al.* (1999), que distribui as temperaturas de tostagem em três faixas:

115 – 125°C, tostagem branda;

200 – 215°C, tostagem média;

220 – 230°C, tostagem severa.

Com relação às temperaturas de tostagem, primeiramente foi foram tomadas amostras de 20g de madeira que foram submetidas à queima em estufa com circulação de ar forçada, em intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Neste ponto do experimento, tivemos um fato importante que foi o de que quando a madeira é aquecida a 200°C por períodos superiores a 45 minutos, esta entra em ignição. Desta maneira o experimento prosseguiu com os extratos obtidos da queima da madeira nas temperaturas de 150° e 200° com amostras retiradas da estufa nos intervalos de 15; 30; 45 e 60 minutos, exceto para os testes a 200° que teve a retirada de sua última amostra com 45 minutos de tratamento térmico.

Outro aspecto visando a melhoria de rendimento foi a substituição da cachaça retificada e neutralizada, por uma solução etanólica a 50% (v/v) com pH ajustado para 4,2 com ácido clorídrico 1,0M, visto que a etanólise é favorecida neste pH segundo CALDEIRA *et al* (1996), e por fim, foi empregado um banho ultra sônico para a extração, em substituição da extração a quente por refluxo, visto que em trabalho publicado por CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS (2001), estes pesquisadores buscaram a otimização no processo de obtenção de extratos de *Mikania glomerata* Spreng (Guaco) na forma de pó, afim de determinar via CLAE os seus teores de cumarina, de modo que para este propósito foram avaliadas extrações via maceração, maceração seguida de sonificação, infusão e extração por fluido supercrítico, que apontaram resultados equivalentes entre os extratos obtidos com o uso do ultra som e com o fluido supercrítico. Desta forma, as vantagens econômicas e práticas do método por ultra som foram decisivas para escolha deste processo pelos pesquisadores, para trabalhos com este mesmo

propósito, ou que esta metodologia, seja um ponto de partida para outras investigações que guardem semelhanças com o estudo realizado por aquele grupo.

Nas rotinas de extração que foram realizadas em triplicata para cada amostra, apesar de serem tratadas termicamente 20g de Amburana pulverizada, foram submetidas à extração com 50mL do solvente apenas 1,5g, com a finalidade de precaução para o não comprometimento de relevantes aspectos da CLAE, como a saturação das membranas do sistema de filtração de amostra, das bombas do cromatógrafo e da própria coluna analítica por excesso de carga, o que acarretaria distorções na resolução dos picos e redução na sua vida útil.

Os dados obtidos para os extratos nas várias condições avaliadas, encontram-se registrados na TABELA 10.

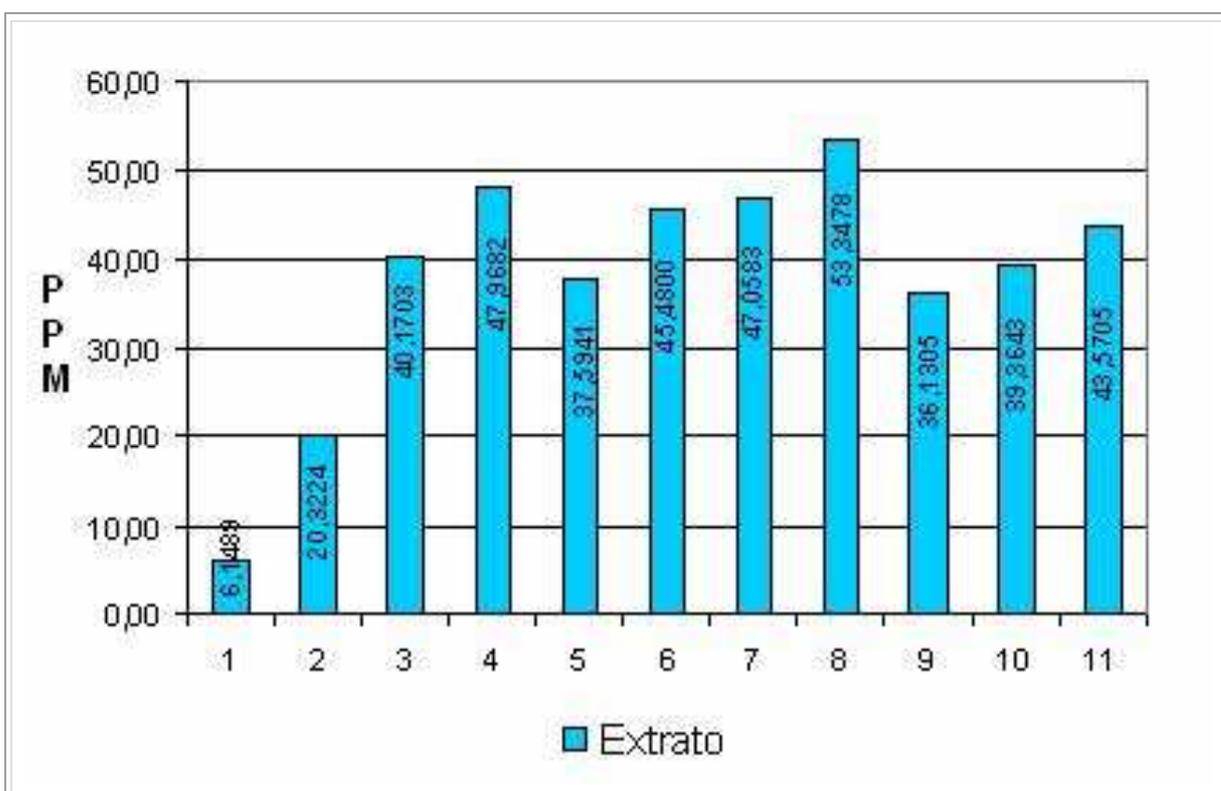
**TABELA 10** – Composição (ppm) para os analitos quantificados nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados.

Extrato	Analito (ppm)										Total
	Ac. Gálico	5-HMF	Furfural	Ac. Vanílico	Ac. Siríngico	Vanilina	Siringaldeído	Coniferaldeído	Sinapaldeído	Cumarina	
<b>150-15-60</b>	1,0119 ± 0,070	<LQ	0,3489 ± 0,027	<LQ	0,5909 ± 0,024	1,5199 ± 0,043	0,7804 ± 0,047	1,0613 ± 0,049	0,8356 ± 0,047	<LD	<b>6,1489</b>
<b>150-30-60</b>	1,0875 ± 0,068	0,825 ± 0,024	0,4325 ± 0,039	<LQ	4,2738 ± 0,153	6,9674 ± 0,243	3,4532 ± 0,141	1,9856 ± 0,081	1,1285 ± 0,04	<LD	<b>20,3224</b>
<b>150-45-60</b>	1,1922 ± 0,071	0,1046 ± 0,003	0,7596 ± 0,030	0,3656 ± 0,036	6,3214 ± 0,395	12,8768 ± 0,797	16,3017 ± 0,326	0,6330 ± 0,034	1,5681 ± 0,056	0,0473 ± 0,049	<b>40,1703</b>
<b>150-60-60</b>	0,7921 ± 0,075	0,3516 ± 0,012	3,9733 ± 0,158	1,2693 ± 0,092	7,5600 ± 0,295	12,5455 ± 0,432	17,522 ± 0,297	1,7497 ± 0,105	2,1385 ± 0,066	0,0662 ± 0,034	<b>47,9682</b>
<b>200-40-15</b>	1,2678 ± 0,063	1,0393 ± 0,029	4,5797 ± 0,109	2,7107 ± 0,135	3,6746 ± 0,169	3,5308 ± 0,156	8,1804 ± 0,712	3,5456 ± 0,148	9,0033 ± 0,216	0,0619 ± 0,084	<b>37,5941</b>
<b>200-40-30</b>	0,9913 ± 0,109	0,9473 ± 0,038	6,0177 ± 0,126	2,5930 ± 0,158	2,9092 ± 0,113	3,7418 ± 0,275	14,9075 ± 0,485	3,7009 ± 0,133	9,4953 ± 0,313	0,1760 ± 0,018	<b>45,4800</b>
<b>200-40-45</b>	1,1168 ± 0,078	1,0392 ± 0,035	5,3214 ± 0,154	2,8496 ± 0,144	2,9963 ± 0,149	7,2621 ± 0,477	13,4370 ± 0,269	3,6927 ± 0,155	9,1703 ± 0,193	0,1729 ± 0,019	<b>47,0583</b>
<b>200-40-60</b>	1,2357 ± 0,84	1,3997 ± 0,043	7,1196 ± 0,213	3,0763 ± 0,128	3,7872 ± 0,176	8,4382 ± 0,592	14,1288 ± 0,812	4,0658 ± 0,154	9,9120 ± 0,347	0,1845 ± 0,022	<b>53,3478</b>
<b>Mic ondas 1 min.</b>	<LD	<LD	0,3114 ± 0,012	3,9410 ± 0,161	4,6118 ± 0,258	9,0513 ± 0,262	15,5341 ± 0,739	0,6046 ± 0,035	2,0763 ± 0,058	<LD	<b>36,1305</b>
<b>Mic ondas 2 min.</b>	<LD	<LQ	1,1056 ± 0,026	3,2539 ± 0,114	5,1984 ± 0,333	11,2268 ± 0,523	17,0406 ± 0,806	0,9053 ± 0,048	0,6337 ± 0,025	<LQ	<b>39,3643</b>
<b>Refluxo</b>	<LD	1,0124 ± 0,039	6,3422 ± 0,209	2,5785 ± 0,126	4,0576 ± 0,154	4,3508 ± 0,141	10,2622 ± 0,628	4,4712 ± 0,124	10,3244 ± 0,413	0,1712 ± 0,026	<b>43,5705</b>

Em Azul, extratos obtidos a 150°C, com tempo de tostagem variado e extração ultra sônica por 60min; em vermelho, extratos obtidos a 200°C, com tempo de tostagem fixo em 40min e extração ultra sônica por tempo variável; em verde, extratos obtidos por exposição da madeira a microondas de um forno de 800W com frequência de 2,45GHz e extraídos por ultra som num período de 60min e em laranja, extratos obtidos por refluxo de madeira por 60min a partir do início da ebulição do solvente e extração por ultra som em 60min.

**Onde:** xxx – yy – zz ⇒ XXX = temperatura (°C) de tostagem; YY = tempo (min) de tostagem e ZZ = Tempo (min) de extração em banho ultra sônico.

Tomando-se o somatório dos compostos fenólicos quantificados em cada extrato como primeiro parâmetro comparativo, vemos que o aumento do total de compostos desejáveis é claramente influenciado tanto pelo acréscimo de tempo de tratamento térmico como de exposição ao ultra-som, o que fica melhor ilustrado pela **FIGURA 12**, onde inclusive pode-se perceber ciclos de elevação nos intervalos 1 - 4, 5 - 8 e 9 - 10, os quais representam extratos que seguem o mesmo padrão de obtenção com alterações efetuadas em apenas uma de suas variáveis.



**FIGURA 12** – Concentração total (ppm) dos analitos nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados.

**Condições de obtenção dos extratos:** 1: Tostagem 150°C por 15, sonificação por 60`; 2: Tostagem 150°C por 30`, sonificação por 60`; 3: Tostagem 150°C por 45`, sonificação por 60`; 4: Tostagem 150°C por 60`, sonificação por 60`; 5: Tostagem 200°C por 40`, sonificação por 15`; 6: Tostagem 200°C por 40`, sonificação por 30`; 7: Tostagem 200°C por 40`, sonificação por 45`; 8: Tostagem 200°C por 40`, sonificação por 60`; 9: Aquecimento em forno de microondas de 800W de potência em sua capacidade máxima por 1`, sonificação por 60`; 10: Aquecimento em forno de microondas de 800W de potência em sua capacidade máxima por 2`, sonificação por 60`; 11: Tostagem 200°C por 40`, refluxo por 60` a partir do início da ebulição.

O extrato 1 da FIGURA 11 (primeira linha da TABELA 10), que apresenta níveis de fenólicos baixos em relação aos demais extratos testados e da mesma ordem de grandeza quando comparado com os obtidos pela metodologia descrita no item 4.2.1 (TABELA 9) que foram respectivamente de 5,6 e 6,1ppm demonstra bem que o uso da madeira pulverizada é benéfico quando se busca extratos de altos rendimentos, visto que as quantificações determinadas para o extrato obtido da madeira macerada originou-se de 1,5g, enquanto que para o extrato obtido pelas metodologia mais comumente citada na literatura foram usados em média 60g por replicata.

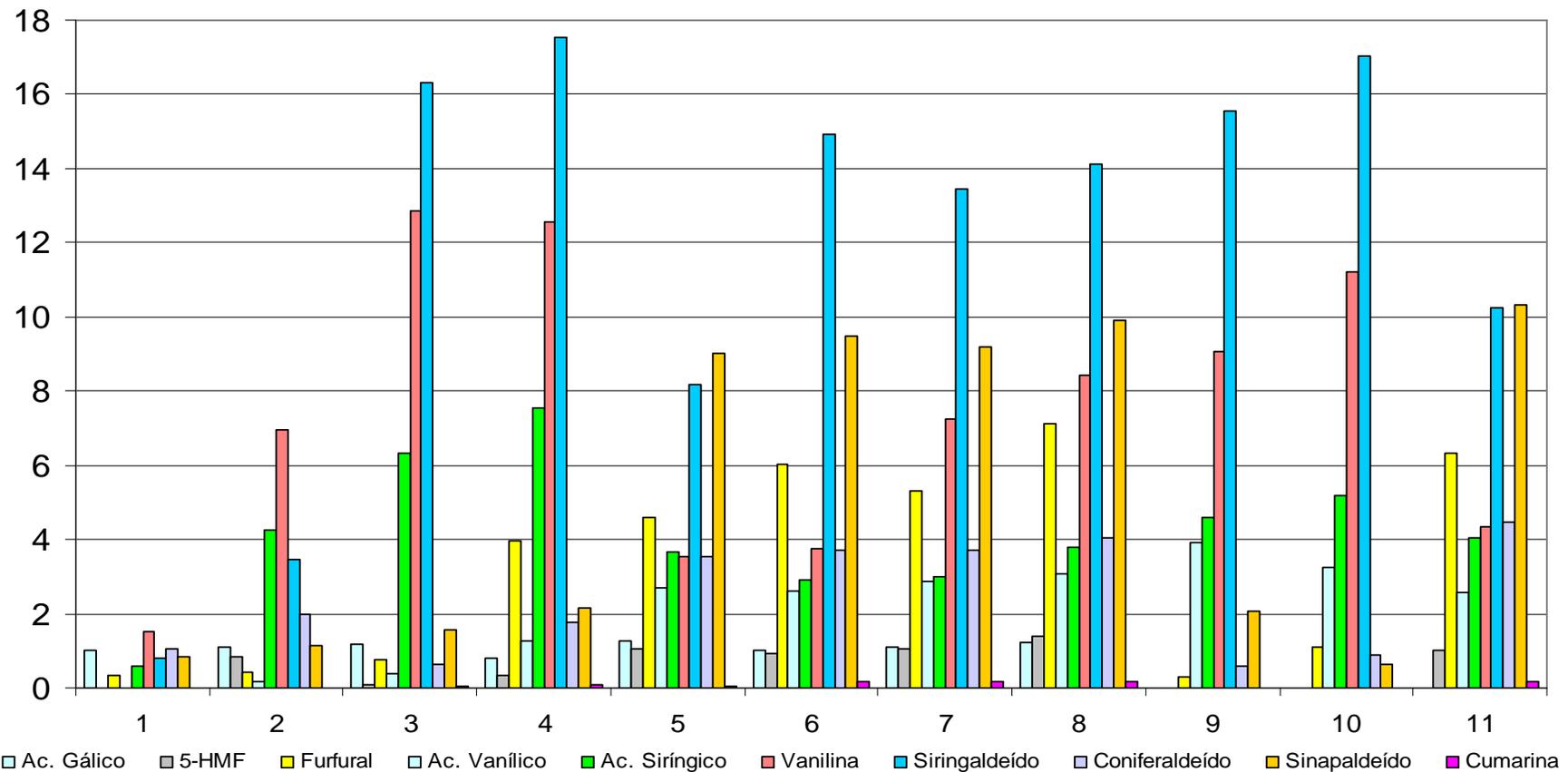
As grandes elevações das quantidades de fenólicos constatadas nos demais extratos em relação ao extrato 1, refletem as contribuições devidos as demais variáveis (temperatura, tempo de extração, e tempo de exposição ao tratamento térmico).

Para os extratos gerados por tratamento térmico em microondas, apesar de bons resultados no tocante ao somatório dos fenólicos, vemos pela FIGURA 12, que o conteúdo dos extratos encontra-se centralizado na vanilina e no siringaldeído.

A FIGURA 13, também ilustra de forma clara que os extratos obtidos na temperatura de 200°C são os de melhores distribuições para o conjunto de fenólicos analisados entre os todos os estrados trabalhado, além de apresentarem melhores rendimentos. Com relação aos extratos obtidos com tratamento térmico a 150°C, estes revelaram-se mais ricos em vanilina e siringaldeído.

Também podemos afirmar pelos dados obtidos que o siringaldeído é o composto típico dos extratos de Amburana, pois mesmo com todas as variáveis aplicadas, apenas no primeiro extrato que em relação aos demais apresentou rendimentos abaixo dos demais.

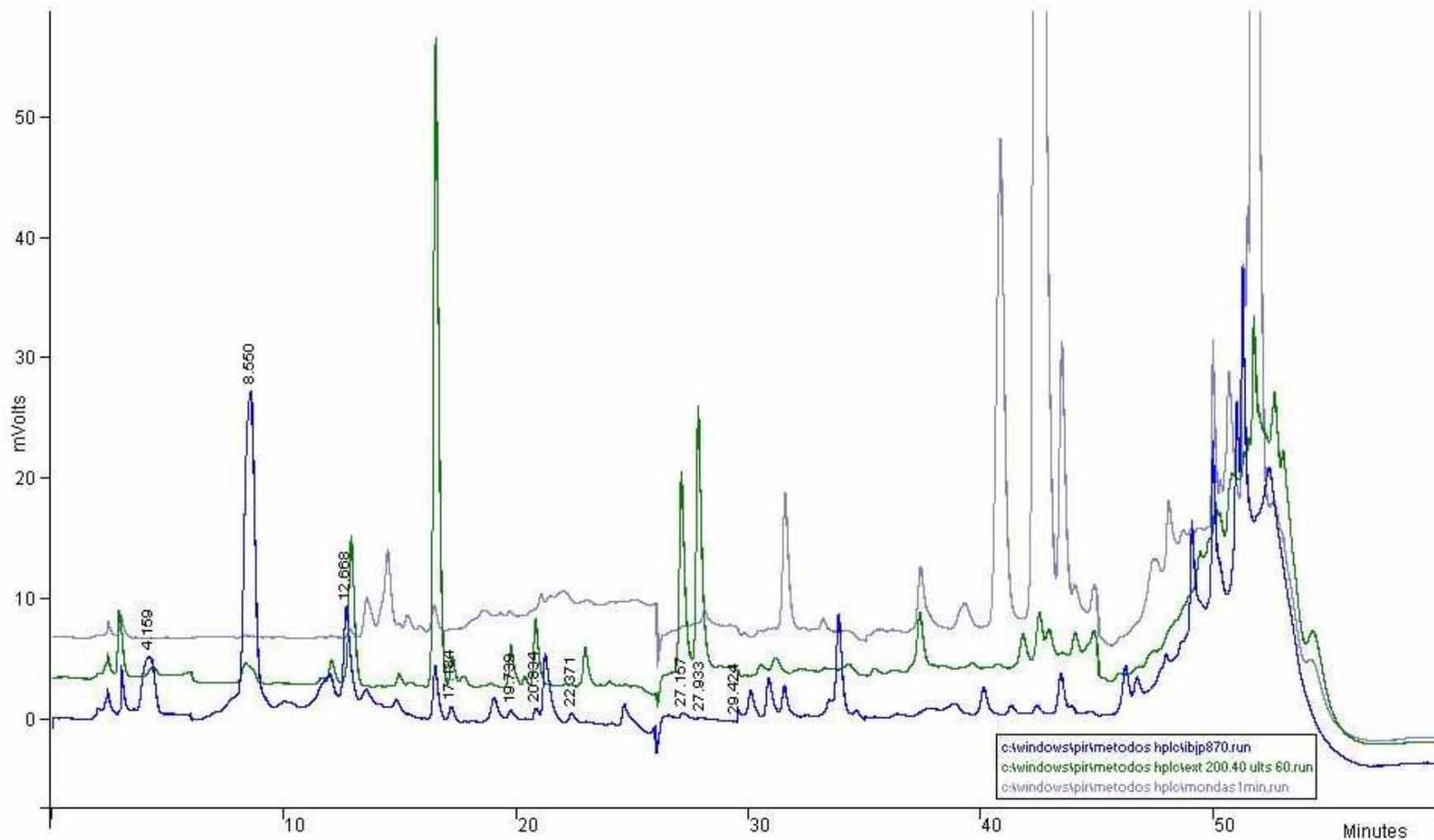
Na FIGURA 14 são apresentados os cromatogramas de extratos e de uma amostra de uma cachaça envelhecida, onde se pode perceber além do perfil destas amostras, o alto desempenho do método analítico.



**Condições de obtenção dos extratos:** 1: Tostagem 150°C por 15, sonificação por 60'; 2: Tostagem 150°C por 30', sonificação por 60'; 3: Tostagem 150°C por 45', sonificação por 60'; 4: Tostagem 150°C por 60', sonificação por 60'; 5: Tostagem 200°C por 40', sonificação por 15'; 6: Tostagem 200°C por 40', sonificação por 30'; 7: Tostagem 200°C por 40', sonificação por 45'; 8: Tostagem 200°C por 40', sonificação por 60'; 9: Aquecimento em forno de microondas de 800W de potência em sua capacidade máxima por 1', sonificação por 60'; 10: Aquecimento em forno de microondas de 800W de potência em sua capacidade máxima por 2', sonificação por 60'; 11: Tostagem 200°C por 40', refluxo por 60' a partir do início da ebulição.

**Onde:** O termo Sonificação, refere-se à via de extração por imersão do material testado em banho ultra sônico.

**FIGURA 13** – Distribuição (ppm) dos analitos nos extratos obtidos pelos diferentes processos testados.



Nota: Condições cromatográficas descritas nos itens 3.2.4.2. e 3.3.

**FIGURA 14** – Sobreposições de cromatogramas de extratos e de uma amostra de cachaça envelhecida: Extrato com uso de microondas (lilás), com estufa a 200° (verde), cachaça (azul).

#### **4.2.3. Determinação de compostos fenólicos de baixo peso molecular em cachaças envelhecidas do Ceará.**

Para efeito comparativo, foram analisadas as seguintes amostras comerciais envelhecidas: Ypióca 150 anos - Ceará, Pitu Gold – Pernambuco e cachaça Do Engenho - Minas Gerais, que foram escolhidas por serem as cachaças envelhecidas produzidas em larga escala, mais vendidas no Ceará e Pernambuco (consumidores de hábitos relativamente próximos), respectivamente, e em comparação com uma bebida de Minas Gerais, distribuída nacionalmente por um rede de supermercados.

**TABELA 11** – Quantificação (ppm), de compostos fenólicos de baixo peso molecular, em cachaças envelhecidas do Ceará.

Região	Ac. Gálico	5-HMF	Furfural	Ac. Vanílico	Ac. Siríngico	Vanilina	Siringaldeído	Coniferaldeído	Sinapaldeído	Cumarina	Total
Cariri 1	<LD	7,8059	1,2230	0,5646	1,0311	0,5204	6,5633	0,3337	0,3385	<LD	18,3805
Cariri 2	<LD	0,3789	0,2790	0,4786	0,3772	0,1059	0,1405	0,1556	0,4512	<LD	2,3669
Cariri 3	<LD	<LQ	0,5941	0,1592	0,2261	0,1545	0,2478	<LD	5,1228	0,0694*	6,5045
Cariri 4	0,3561	0,3290	2,2803	2,8772	7,5500	5,8665	32,3258	1,4172	0,9505	0,051*	53,9526
Cariri 5	1,7580	1,0510	0,9133	1,7086	4,9019	6,6682	37,3563	1,8104	0,7713	0,0457*	56,9390
Cariri 6	0,4427	0,3568	9,6183	0,1665	0,6189	0,4538	0,1280	<LD	4,0970	0,0532*	15,8820
Cariri 7	<LD	4,8790	0,2442	0,7015	<LD	<LD	9,2634	0,0850	0,5379	0,0571*	15,7110
Cariri 8	<LD	2,7906	0,4576	0,3853	1,3832	0,1351	0,0080	0,0014	0,3294	0,0582*	5,4906
Cariri 9	<LD	10,1796	0,3043	<LD	0,4117	0,1582	1,3358	0,0162	0,2725	0,0502*	12,6783
Cariri 10	1,2640	0,3114	0,2541	0,5315	0,1258	0,6096	1,9076	0,6254	0,8872	0,0321*	6,5166
M. Baturité 1	<LD	21,1840	1,0413	0,2340	1,1231	1,8155	10,5564	0,0499	1,6384	0,3788	38,0214
M. Baturité 2	2,6480	0,7585	0,6956	2,3104	1,1434	1,5193	1,9934	1,6567	0,3918	0,0569*	13,1171
M. Baturité 3	<LD	<LQ	0,2555	0,5969	0,7341	0,5214	0,4678	<LQ	4,6884	0,083*	7,2641
M. Baturité 4	<LD	0,1812	0,6260	1,4716	4,8728	4,4535	2,5199	1,1647	0,3790	0,9747	16,6434
M. Baturité 5	<LD	0,0578	0,1576	1,8684	3,2546	2,3480	7,6857	1,4656	0,2684	0,0486*	17,1061
M. Baturité 6	0,2087	0,4631	0,1959	1,0613	8,9574	0,1832	2,2806	<LD	6,1073	0,0859*	19,4575
M. Baturité 7	<LD	1,0707	1,5428	3,5375	6,1898	4,3442	13,2293	1,5669	0,7502	0,0703*	32,2314
M. Baturité 8	0,3096	0,4599	0,2296	2,1351	7,8195	0,2156	1,3320	<LD	8,1264	0,0672*	20,6277
M. Baturité 9	<LD	0,6450	0,1698	0,3092	0,6902	0,5681	0,4281	0,1062	0,5518	0,4116	3,8800

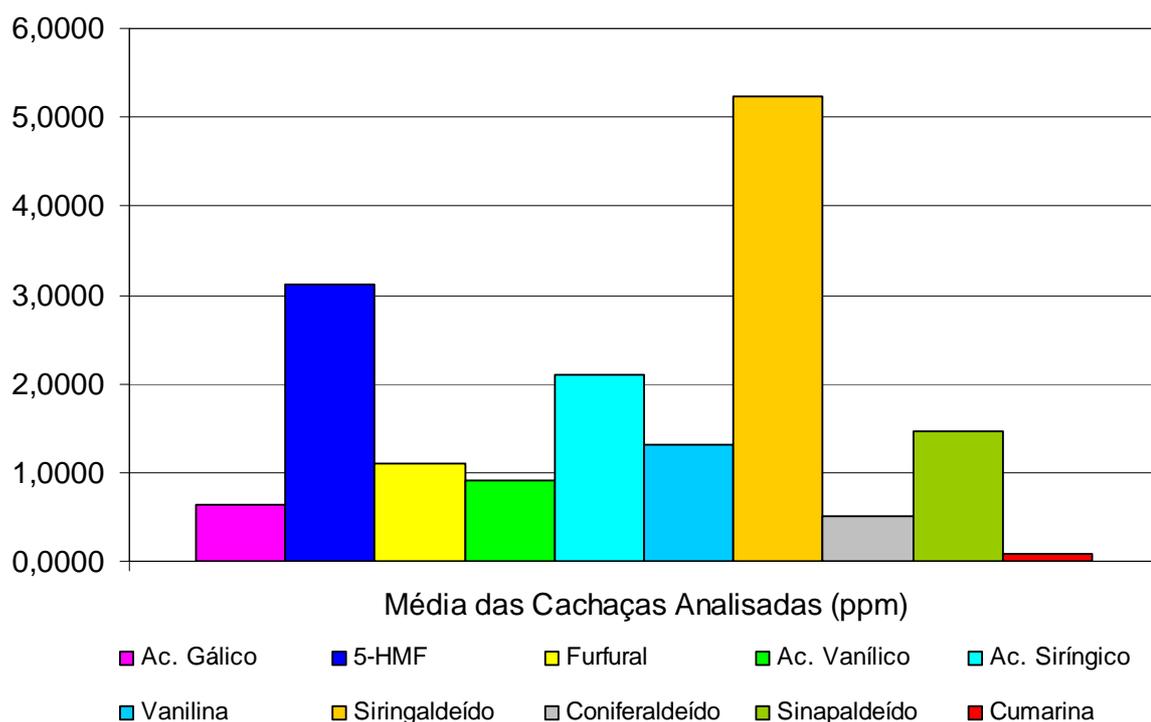
**TABELA 11 (Cont.)** – Quantificação (ppm), de compostos fenólicos de baixo peso molecular, em cachaças envelhecidas do Ceará.

Região	Ac. Gálico	5-HMF	Furfural	Ac. Vanílico	Ac. Siringico	Vanilina	Siringaldeído	Coniferaldeído	Sinapaldeído	Cumarina	Total
Sertão Central 1	<LD	1,8110	0,2165	0,0971	0,3670	0,2291	5,2510	0,2024	0,7354	0,1892	9,0987
Sertão Central 2	<LD	0,4123	1,4953	<LD	<LD	0,1465	<LD	0,1609	0,2654	<LD	2,4804
RMF 1	<LD	2,0563	0,3261	0,2912	0,1276	0,3389	0,4673	1,3694	0,1580	0,0561*	5,1348
RMF 2	<LD	5,4015	0,3312	0,7870	2,7502	2,1484	4,9885	0,1714	0,6205	0,3568	17,5555
RMF 4	<LD	LD	0,1822	0,3224	0,1581	0,5322	0,4129	<LQ	0,9710	0,3562	2,9350
RMF 5	<LD	LD	0,1759	0,1302	0,7762	1,0955	2,6894	<LQ	0,1809	0,0592*	5,0481
Ibiapaba 1	10,6324	19,0502	4,7810	1,7163	1,7943	0,7739	0,9678	0,3988	0,5353	<LD	40,6500
Ibiapaba 2	<LD	5,0377	1,3810	0,6013	0,6652	0,4253	2,2902	1,4666	0,6413	<LD	12,5086
Ibiapaba 3	<LD	0,4405	0,7389	0,2171	0,7957	0,6100	<LD	<LD	0,2980	0,0797*	3,1002
Ypioca	<LD	1,8330	0,6927	0,9443	0,6579	1,4903	5,1776	1,2496	1,1889	<LQ	13,2343
Do Engenho	<LD	0,5791	1,1271	1,7113	1,3417	1,4984	1,6596	1,1847	2,0813	0,1287	11,3119
Pitu Gold	0,4584	0,0585	0,4984	0,3269	3,8236	1,6350	11,9588	1,3262	0,4365	<LQ	20,5223

\* Concentração em ppm para cumarina <LQ, sendo desta forma estimada matematicamente pelo software controlador do sistema cromatográfico.

Amostras em azul referem-se as cachaças tomadas como referência.

**Nota:** Condições cromatográficas descritas nos itens 3.2.4.2. e 3.3.



**FIGURA 15** – Comparativo entre os valores médios (ppm), determinados para cada analito nas amostras analisadas de cachaças cearenses envelhecidas.

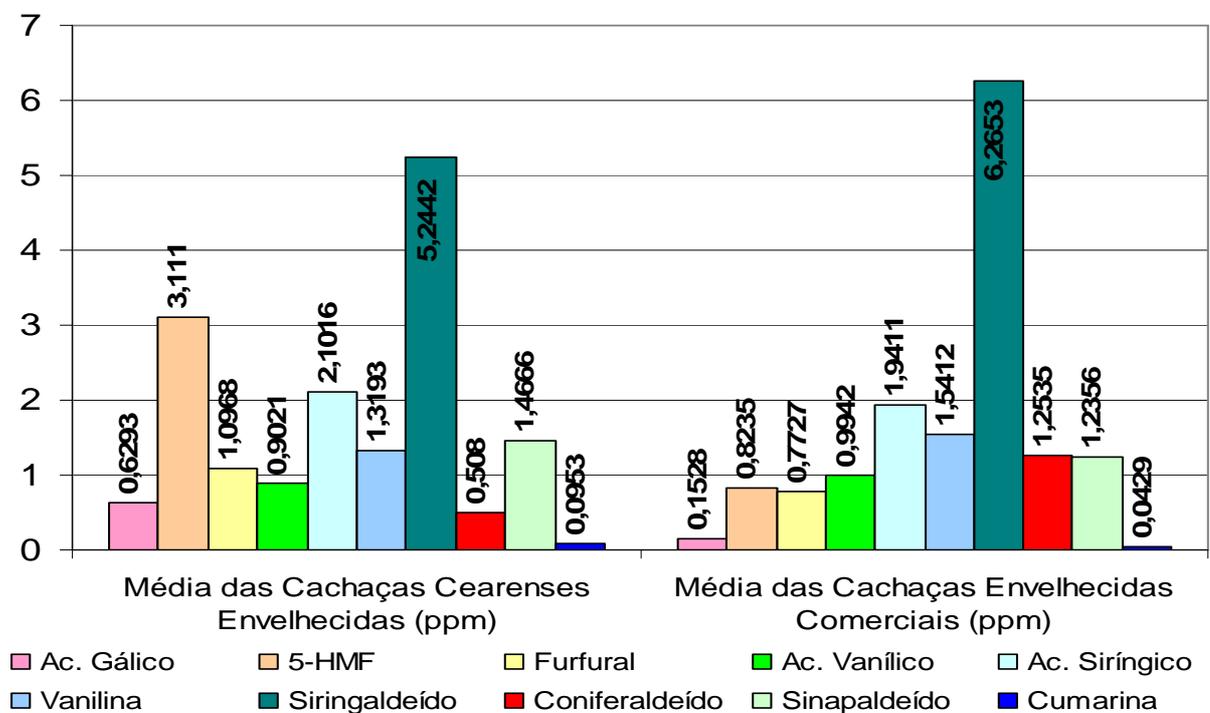
Coefficientes de variação (%) por analito para as amostras de cachaças envelhecidas do Ceará: Ácido Gálico, 19,94%; 5-hidroximetilfurfural, 6,59%; Furfural, 6,25%; Ácido Vanílico, 3,71%; Ácido Siríngico, 4,58%; Vanilina, 4,95%; Siringaldeído, 6,35%; Coniferaldeído, 4,75%; Sinapaldeído, 5,08%; Cumarina, 10,15%.

Com relação aos valores de coeficiente de variação determinados para cada analito temos:

- Apesar de elevados, os valores para o ácido gálico e para a cumarina, podem ser justificados pelos baixos níveis em que são encontrados nas amostras, onde o ácido gálico varias vezes apresentou-se abaixo do limite de detecção e para cumarina, mesmo tendo sido detectados com pequena possibilidade de equívoco (devido às características do método validado) seus valores em algumas amostras foram calculados com incremento do erro analítico devido as suas áreas correspondentes encontrarem-se entre os limites de detecção e de quantificação.

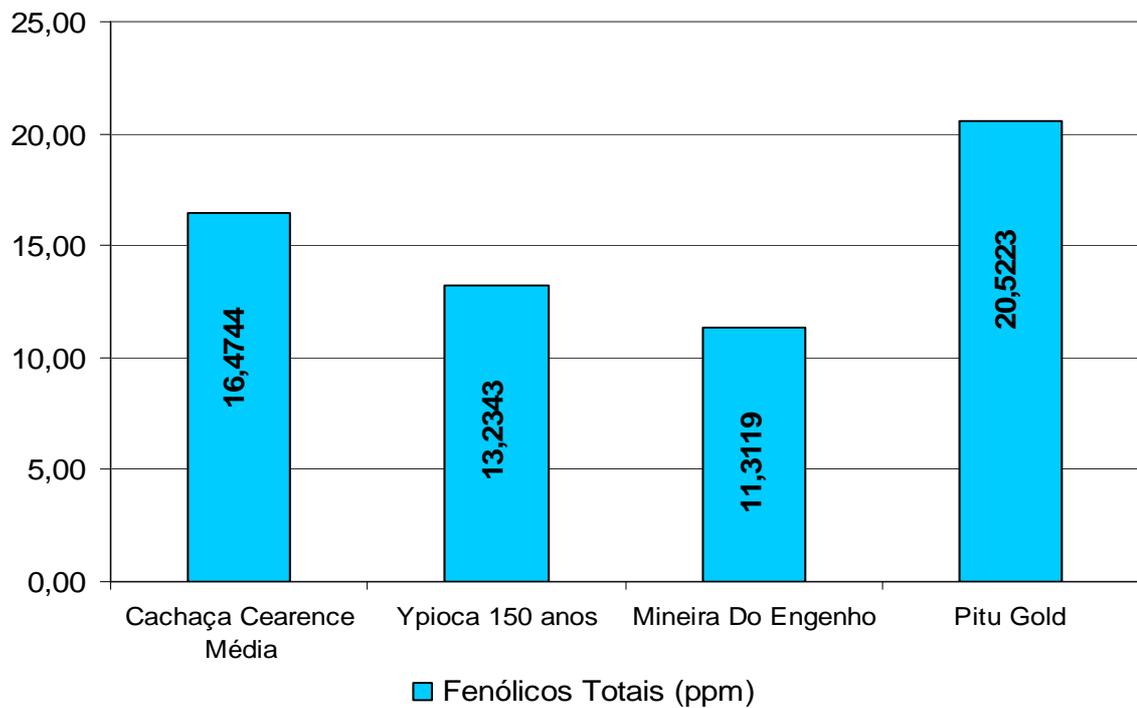
- Com relação ao 5-HMF, mesmo com seu coeficiente de variação figurando em um nível relativamente baixo, a remoção dos valores quantificados nas amostras Cariri 9, Maciço de Baturité 1 e Ibiapaba 1 (contidos na TABELA 11), devido estas amostras apresentarem teores de 5-HMF anormalmente elevados quando comparados aos determinados nas demais amostras, reduziu o valor do coeficiente de variação em aproximadamente 3 vezes (de 6,59; para 2,17%), sendo desta maneira um indicativo de condições anômalas no envelhecimento destas bebidas.
- Para os demais analitos, as suas variações, quer em termos absolutos ou na forma de coeficiente de variação, e ainda com relação às proporções entre si, podem ser consideradas como normais devido principalmente as diferentes madeiras dos seus tonéis e ao seu tempo de guarda.

No tocante a distribuição média dos analitos nas amostras de cachaças envelhecias do Ceará versus os encontrados para as amostras de cachaças de referência analisadas, temos com exceção para o 5-HMF e para o Siringaldeído, uma elevada correspondência, como observado na FIGURA 16.



**FIGURA 16** – Comparativo entre os valores médios (ppm) determinados para cada analito nas amostras de cachaças cearenses envelhecidas e nas cachaças envelhecidas de referência analisadas.

Conforme esperado em função dos teores individuais por analito, o somatório destes para a média das amostras de cachaças cearenses analisadas, encontram-se em um patamar que figura entre as quantidades mínimas e máximas determinadas nas amostras de referência, como pode ser constado na FIGURA 17.



Coefficiente de variação (CV%) para o somatório dos analitos nas amostras de cachaças envelhecidas do Ceará = 10,15%.

**FIGURA 17** – Comparativo entre o teor médio dos compostos fenólicos (ppm), de baixo peso molecular, analisados nas amostras de cachaças envelhecidas do Ceará e nas cachaças de referência.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O método cromatográfico, otimizado após testes práticos, e submetido ao processo de validação, cumpriu os requisitos necessários para a sua aprovação, o que nos permite afirmar que as determinações de ácido gálico, 5-hidroximetilfurfural, furfural, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído e cumarina em extratos de Amburana e em cachaças apresentam linearidade, precisão e exatidão satisfatórias para o seu uso em outros trabalhos e em análises de rotina.
- A Amburana, após ter seu extrato avaliado por comparação com os extratos de Bálsamo e Carvalho (respectivamente, madeiras tradicionalmente usadas no Brasil e referência mundial para envelhecimento), pela metodologia citada na literatura internacional e também usada por CAMPOS (2000), apresentou um potencial gerador de compostos fenólicos de baixo peso molecular, compatíveis com as duas madeiras usadas como referências.
- As tentativas de otimização do processo de obtenção do extrato de Amburana que envolveram o uso da madeira pulverizada, variações de temperatura e tempo de tostagem, visto que a madeira pulverizada apresenta um comportamento diferente dos cubos frente ao calor, o emprego de uma solução etanólica a 50% com pH ajustado para 4,2, a utilização de ultra-som e do forno de microondas, culminaram em extratos com melhores rendimentos e em menores tempos que os extratos obtidos pela metodologia de extração através de refluxo que é o procedimento mais comumente aplicado.
- As condições de tratamento, a 150°C por 60 minutos e 200°C por 40 minutos, apresentaram extratos com rendimentos totais em patamares relativamente próximos. No entanto, os extratos obtidos a 150°C apresentaram na distribuição dos analitos maiores teores de siringaldeído e vanilina, enquanto que os extratos

a 200°C mostraram, além de altos níveis para os mesmos compostos, também uma distribuição mais ampla para os demais compostos, o que provavelmente acarretará cachaças com nuances sensoriais diferentes em cada adição de extrato numa mesma cachaça.

- Os extratos obtidos por microondas apresentaram os mais baixos níveis de furfural entre todos os extratos. Entretanto, as quantidades de coniferaldeído e sinapaldeído foram baixas, o que pode comprometer o perfil de ésteres formados após a maturação da bebida adicionada destes extratos, devido as desagradáveis características sensoriais deste composto.
- Para todos os extratos, os níveis de cumarina foram muito baixos e, em alguns casos, aquém do limite de detecção do método, fato este que pode ser encarado como bastante favorável, visto que a literatura consultada e as mais recentes pesquisas ainda não apontam uma posição conclusiva sobre a inocuidade da cumarina para a saúde do homem. Estes níveis apontam ainda uma concordância com a literatura sobre a distribuição da cumarina na Amburana que ocorre principalmente na sua casca, porção esta que não foi utilizada pelos altos teores de compostos adstringentes.
- As pequenas quantidades de cumarina, no entanto, podem ser usadas para estimar ou comprovar o envelhecimento de uma bebida, o que pode vir a ser efetuado com a inserção de uma etapa de pré-concentração no método, como por exemplo, o uso de cartuchos de extração em fase sólida, ou a redução do volume das amostras por evaporação a vácuo (a cumarina exibe boa resistência térmica) entre outras técnicas.
- No tocante ao perfil dos compostos fenólicos de baixo peso molecular nas amostras de cachaça cearense, a média obtida para o total destes compostos, e ainda a sua distribuição, assemelharam-se intensamente com os mesmos dados gerados para a média das cachaças envelhecida de referência. Entretanto, estudos mais aprofundados, incluindo análises sensoriais, com amostras

adicionadas destes extratos e submetidos a um período de repouso serão necessários.

- As três cachaças com altos níveis de 5-HMF; Cariri 9, Maciço de Baturité 1 e Ibiapaba 1, podem ser oriundas de tonéis bastante usados, que não sofreram nenhum tratamento para a sua recuperação como, por exemplo, a raspagem de suas paredes e uma nova queima.
- Uma outra possível aplicação para a Amburana seria a confecção de saches com o pó desta madeira, tratada nas condições descritas neste trabalho e a inserção destes em tonéis exauridos a fim prolongar o uso dos mesmos, ou para os fabricados com outras espécies, possibilitar blends, que aproveitariam as características de cada madeira.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.; VALSECHI, O.; NOVAIS, R.F. Envelhecimento das aguardentes. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. Piracicaba. v.4, p.11 - 83, 1947.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. Anatomia das Plantas Angiospermas. In: AMABIS, J.M. & MARTHO, G.R. **Biologia dos organismos: Classificação, estrutura e função dos seres vivos**. 1ª ed. São Paulo: Editora Moderna, 1997. 2., 614 – 616.

BARROSO, C.G.; RODRÍGUES, D.A.; GUILLÉN, J.A.; BUSTAMANTE, P. Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in brandy de Jerez by high-performance liquid chromatography - Diode array detection with direct Injection. **J. Chromatography A**. n.724, p.125 - 129, 1996.

BELCHIOR, A.P.; CALDEIRA, I.; TRALHÃO, G.; COSTA, S.; LOPES, C.; CARVALHO, E. Incidência da origem e da queima da madeira de Carvalho (*Q. pyrenaica*, *Q. robur*, *Q. sessiliflora*, *Q. Alba/Q. stellata+Q. bicolor*) e de Castanho (*C. sativa*) em características físico-químicas e organolépticas de aguardentes Lourinha em envelhecimento. **Ciência e Tecnologia Vitivinícola**, v.13, n.1-2, p.107 - 118, 1998.

BOGAN, D.P.; O'KENNEDY, R. Simultaneous determination of coumarin, 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatography B**. n.686, p. 267 - 273, 1996.

BOSCOLO, M. **Estudo do envelhecimento de aguardente de cana**. São Carlos, 1996. 85p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BOWEN, D.; BENNING, J.; BRONZERT, C.; ELLISON, A. Process for preparing an oak wood extract and distillate. **United States Patent**. 1994.

BOZA, Y.; HORII, J. A destilação na obtenção de aguardente de cana de açúcar. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.33, n.1, p. 98 - 105. 1999.

BOZA, Y; OETTERER, M. Envelhecimento de aguardente de cana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.33, n.1, p.8 -15, 1999.

BOZHINOV, A. Study of the processes occurring during ageing of wine distillate. **Khranitelna Promishlenost**. v.43, n.3, p.25 - 27, 1994.

BRASIL. Portaria nº 371, do Ministério da Agricultura. Destilados alcoólicos, **Diário Oficial da União**, 9 de outubro de 1974.

BRASIL. Decreto nº 2.314, do Ministério da Agricultura. **Diário Oficial da União**, 4 de setembro de 1997.

BRASIL. Decreto nº 4.062, do Ministério da Agricultura. **Diário Oficial da União**, 21 de dezembro de 2001.

BRASIL. Decreto nº 4.072, do Ministério da Agricultura. **Diário Oficial da União**, 3 de janeiro de 2002.

BRENDOLAN, G. Validação de métodos cromatográficos. Pedreira - SP: **Expolabor & Isolabro Consultoria e Treinamento**, 2000. 72p.

BREGVADZE, U. D. Maturation of brandy. **USSR – Patent**. 1991.

BRONZE, M.R.; VILAS-BOAS, L.F.; BELCHIOR, A.P. Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. **J. Chromatography A**. n.768. p.143 - 152, 1997.

CALDEIRA, I.; BELCHIOR, A. P; CLÍMACO, M.C.; SOUSA, R.B. Aroma profile of portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. **Anal. Chim. Acta**. n.458, p.55 - 62, 2002.

CALDEIRA, I.; CANAS, S.; COSTA, S.; CARVALHO, E.; BELCHIOR, A. P. Formação de uma câmara de prova organoléptica de aguardentes velhas e selecção de descritores sensoriais. **Ciência e Tecnologia Vitivinícola**, v.14, n.1, p.21 - 30, 1999.

CALDEIRA, I.; CANAS, S.; COSTA, S.; CARVALHO, E.; BELCHIOR, A. P. Pesquisa e selecção de descritores sensoriais para aguardentes velhas. In: 4º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO, v.2, Évora, 159 - 165. 1998.

CALDEIRA, I.; CANAS, S.; BELCHIOR, A.P. Otimização das condições de extração de aparas de madeira. Relatório Interno, Secção de Aguardentes, EVN-INIA, 1996.

CAMPOS, J. O. S. **Emprego de Extratos Aromáticos de Madeiras Regionais Como Agentes de envelhecimento Acelerado de Aguardentes**. Fortaleza, Ceará, 2000. 102 p. Dissertação de Mestrado.

CAMPOS, J. O. S.; AQUINO, F.W.B.; NASCIMENTO, R.F.; COSTA, J.GM.; KEUKELEIRE, D.; CASIMIRO, A.R.S. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **J. Food Comp. Anal.** V.17, p.179 - 185, 2004.

CANAS, S.; GRAZINA, N.; BELCHIOR, A.P.; SPRANGER, M.I; SOUSA, R.B. Modelisation of heat treatment of portuguese oak wood (*Quercus pyrenaica* L.). analysis of the behaviour of low molecular weight phenolic compouds. **Ciência e Tecnologia Vitivinícola**. v.15, n.2, p.75 - 94, 2000).

CANAS, S.; LEANDRO, M.C.; SPRANGER, M.I; BELCHIOR, A.P. Low molecular weight organic compounds of chestnut wood (*Castenea stiva* L.) and corresponding aged brandies. **J. Agric. Food Chem.** v.47, n.12, p.5023 - 5030, 1999.

CANUTO, K. M. **Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste: *Herissantia tiubae* (K. Schumann) Briz e *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith.** Fortaleza, Ceará, 2002. 72 p. Dissertação de Mestrado.

CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de Carvalho (*Quercus Alba* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.18, n.2, p.169 – 175, 1998.

CARDELLO, H.M.A.B.; FARIA, J.B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência Interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.20, n.1, p.32-36, 2000.

CARDOSO, D.R.; SOBRINHO, L.G.A.; NETO, A.F.L.; RECHE, R.V.; ISIQUE, W.D.; FERREIRA M.M.C.; NETO, B.S.L.; FRANCO, D.W. Comparison between cachaça and rum using pattem recognition methods. **J. Agric. Food Chem.** v.52, n.11, p.3429 - 3433, 2004.

CARVALHO, M. & SILVA, P. SILVESTRE. **Cachaça: Uma alegre história brasileira.** São Paulo, Caninha 51, 1988. 157 p.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of coumarin in hydroalcoholic extacts of *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco”) leaves. **J. Brazilian Chem. Soc.** v.12, n.6, p.706 - 709, 2001.

CERDÁN, T.G.; MOZAZ S.R.; AZPILICUETA, C.A. Volatile composition of aged wine in used barrels of french oak and of american oak. **Food Res. Int.** v.35, p.603 - 610, 2002.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J. N. Thermal treatment of wood cooperage: Effect on the extractable components of oak and on the sensory characters of wines. **Wines Industry Technical Conference.** n.3, p. 272, 1990.

CHATONNET, P.; CUTZACH, I.; PONS, M.; DUBOURDIEU, D. Monitoring toasting Intensity of barrels by chromatographic: Analysis of volatile compounds from toasted oak wood. **J. Agric. Food Chem.** v.47, n.10, p.4310 - 4318, 1999.

CHAVES, J.B.P. Cachaça: Produto artesanal de qualidade. Viçosa: CPT, Manual Técnico, 1988.

CRIQUI, M.H. Alcohol and coronary heart disease: Consistent relationship and public health implications. **Clin. Chem. Acta.** v.246, p.51 - 57, 1996.

CUTZACH, I.; CHATONNET, P.; HENRY, R.; DUBOURDIEU, D. Identifying New volatile compounds in toasted oak. **J. Agric. Food Chem.** v.47, n.2, p.1663 - 1667, 1999.

CUTZACH, I.; CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D. Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the aging of sweet fortified wines. **J. Agric. Food Chem.** v.47, n.7, p.2837 - 2846, 1999.

D'ÁLMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais. In: D'ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e Papel: Tecnologia da pasta celulósica.** São Paulo: SENAI – Departamento Regional, 1981. v.1, p.43–98.

DIAS, S.; MAIA, A.; NELSON, D. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.18, n.3, p.331 - 334, 1998.

EGOROV, I.A.; RODOPULO, A.K. Investigation of aroma-forming substances in cognac spirits in their aging process. **Appl. Biochem. Microbiol.** v.30, n.4/5, p.539 - 542, 1994.

ESCALONA, H.; BIRKMYRE, L.; PIGGOTT, J.R.; PATERSON A. Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red ine aroma compounds. **Anal. Chim. Acta.** n.458, p.45 - 54, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion on coumarin expressed on 22/09/99. Scientific Committee on food. Disponível em <[http://www.europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/index\\_en.html](http://www.europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/index_en.html)>. Acesso em: 2 maio de 2004.

FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B.; BOSCOLO, M.; ISIQUE, W. D.; ODELLO, L.; FRANCO, D. W. Evaluation of brazilian woods as na alternative to oak for cachaça aging. **European Food Res. Techn.** v.218, n. 1, p.83 – 87, 2003.

FURTADO, S. M. B. **Avaliação descritiva de aguardente de cana. Influência da composição em função de suas características sensoriais e correlação entre as medidas sensoriais e físico-químicas.** Campinas, São Paulo, 1994, 116 p. Tese de Doutorado.

GOLDBERG D.M.; HOFFMAN, B.; YANG, J.; SOLEAS, G.J. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. **J. Agric. Food Chem.** v.47, n.10, p.3978 - 3985, 1999.

GOS, B. Method for accelerating the aging of distillates. **United States Patent.** 1990.

HASLAM, E. Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action. **Trends in Food Science & Technology**. V.10, p.339, 1999.

HOOPER, R.; MARKS, A. New product for Introducing oak derived flavours and aromas to wines. **Australian Grapegrower and Winemaker**. n.337, p.25 - 26. 1992.

IZQUIERDO, M.E.F.; GRANADOS, J.Q.; MIR, V.M.; MARTINEZ, M.C.L. Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. **Food Chem**. v.70, n.2. p. 251 – 258. 2000.

JAGANATHAN, J. DUGAR, S. M. Authentication of straight whiskey by determination of the ratio of furfural to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. **J. AOAC Int**. v.82, n.4, p.997 - 1001, 1999.

KANNEL, W.B.; ELLISON, R.C. Alcohol and coronary heart disease: The evidence for a protective effect. **Clin. Chem. Acta**. v.246, p.59 - 76, 1996.

KORHOLA, M.; HARJU, K.; LEHTONEM M. Fermentation. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUCAN, R. E. B. **The Science and technology of whiskey**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. p.89 - 117.

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food Chem. Toxicol**. v.37, p.423 – 453, 1999.

LEE, K.Y.M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J.R.; RICHARDSON, G.D. Sensory discrimination of blended scotch whiskies of different product categories. **Food Quality and Preference**. V.12, p.109 - 117, 2001.

LEITE, F. In: **Validação em análise química**. Campinas – SP: Editora Átomo Ltda. 1996, 120p.

LKAM, L.; NECHIO M.; SILVEIRA E.R.; CANUTO K.M.; FONTENELE, J.B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA G.S.B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Res.** v.17, n.4, p.335 - 340, 2003a.

LKAM, L.; OLIVEIRA, F.G., FONTENELE, J.B.; FERREIRA, M.A.D.; VIANA G.S.B. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biol.** v.41, n.4, p.308 - 314, 2003b.

LO COCO, F.; VALENTINI, C.; NOVELLI, V.; CECCON, L. Liquid chromatograph determination of 2-furaldehyde and 5- hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. **Anal. Chimica Acta.** n.306, p.57 – 64, 1995.

LÓPEZ, R. Cachaça Amplia potencial de consumo no mercado externo. **Engarrafador Moderno.** nº 110, 19 – 24, 2003.

MAGA, J.A. The contribution of wood to the flavors of alcoholic beverages. **Foods Reviews International.** v.5, n.1, p. 39 - 99, 1989.

MAIA, A. B. Componentes secundários da aguardente. **Revista STAB.** v.6, n.12, p. 29 - 34, 1994.

MAIORELLA, B.L. **Ethanol.** In: **Comprehensive Biotechnology.** Berkeley, University of California, 1989.

MANGAS, J.; RODRIGUEZ, R.; MORENO, J. Evolution of aromatic and furanic congeners in the maturation of cider brandy: A contribution to its characterization. **J. Agric. Food Chem.** v.44, n.10, p. 3303 - 3307, 1996.

MARCO, J.; ARTAJONA, J.; LARRECHI, M.S.; RIUS, F.X. Relationship between geographical origin and chemical composition of wood for oak barrels. **Am. J. Enol. Viticulture.** v.45, p.192 - 200, 1994.

MARINOV, M. Use of micronized oak wood for accelerated ageing of wine distillates. **Khranitelna Promishlenost**. v.45, n.1, p.2 - 7, 1996.

MARTINEZ R.G.; DELASERRANA H.L.G.; MIR M.V.; GRANADOS J.Q.; MARTINEZ M.C.L. Influence of wood heat treatment, temperature and maceration time on vanillin, syringaldehyde, and gallic acid contents in oak wood and wine spirit mixtures. **Am. J. Enol. Viticulture**. v.47, n.4, p.441 - 446, 1996.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. 3ª ed., Edições UFC, Fortaleza-Ce, 1998.

MONEDERO, L.; OLALLA, M.; VILLALÓN, M.; GARCIA-LÓPEZ, H.; LÓPEZ, M.C. Standardisation of the chromatic characteristics of *sobretablas* wine macerates obtained by an accelerated ageing technique using heating and oak shavings. **Food Chem**. v.69, p.47 - 54, 2000.

MORAIS, F.V., Como controlar a qualidade da cachaça. **Engarrafador Moderno**, nº, 24 - 29, 2001.

MORENO, M.V.G.; BARROSO, C.G. Comparison of the evolution of low molecular phenolic compounds in typical sherry wines: Fino, amontilado and oloroso. **J. Agric. Food Chem**. v.50, n.26. p.7556 - 7563, 2002.

MOSEDALE, J.R.; FORD, A. Variation of the flavor and extractives of european oak wood from two french forests. **J. Sci. Food Agric**. v.70, n.3, p.273 - 287, 1996.

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

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

NISTWEBBOOK. Disponível em <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 14 de agosto de 2004.

ONISHI, M.; GUYMON J.F.; CROWELL, E.A. Changes in some volatile constituents of brandy during aging. **Am. J. Enol. Viticulture**. V.28, n.3, p.152 - 158, 1977.

PBDAC - PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA. Disponível em <<http://www.pbdac.com.br>>. Acesso em: 26 abril 2004.

PENSADO, L.; CASAIS, C.; MEJUTO, C.; CELA, R. Optimization of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood samples by the use of microwave energy. **J. Chromatography A**. n.869, p.505 - 513, 2000.

PÉREZ-PRIETO, L.J.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; MÍNGUEZ F. P.; GÓMEZ-PLAZA, E. Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. **J. Agric. Food Chem.** v.50, n.11, p.3272 - 3276, 2002.

PHILP, J.M. Cask quality and warehouse conditions. In: PIGGOTT, J.R.; SHARP, R.; DUCAN, R. E. B. **The Science and technology of whiskey**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. p. 264 - 294.

PIGGOTT, J.R.; HUNTER, E.A.; MARGOMENOU, L. Comparison of methods of analysis of time-Intensity data: Application to scotch malt whisky. **Food Chem.** v.71, p.319 - 326, 2000.

PINHEIRO, S.H.M. **Perfil da qualidade da cachaça do Ceará**. Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza, Ceará, 1999. 133 p. Dissertação de Mestrado.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas Cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura. v.2, p.474 - 475, 1984.

PISARNITSKII, A.F. Acetaldehyde as a factor of lignin degradation in the seasoning of spirits. **Appl. Biochem. Microbiol.** v.31, n.3, p.126 - 128, 1995.

PLANTAMED. Disponível em <<http://www.plantamed.com.br>>. Acesso em: 26 de julho de 2004.

PLAZA, D.E.M.; REYERO, J.R.; PARDO, F.; SALINAS, M.R. Comparison of wine aromas with different tannic content aged in french oak barrels. **Anal. Chimica Acta.** n.458, p.139 - 145, 2002.

PUECH, J.L. Phenolic compounds in oak wood extracts used in the ageing of brandies. **J. Sci. Food Agric.** v.42, n.2, p.165 - 172, 1988.

PUECH, J.L.; GOFFINET, B. Adjustment of nonlines models for lignin and its degradation products during the aging of armagnac. **J. Food Sci.** v.52, n.5, p.1280 - 1282, 1987.

PUECH, J. L.; MAGA, J. Influence of charring of barrels on volatile and non-volatile substances in a spirits. **Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques.** n. 70, p. 13 - 16, 1993.

PUECH, J.L.; RABIER, P.; MOUTOUNET, M. Preparative separation by high-performance liquid chromatography of an extract of oak wood and determination of the composition of each fraction. **J. Chromatography A.** n.457, p.431 - 436, 1988.

QUESADA, J.G.; VILLALON, M.M.; LOPEZ, G.S.H.; LOPEZ, M.M.C. Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies: Aging marks. **J. Agric. Food Chem.** v.44, n.6, p.1378 - 1381, 1999.

REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whisky maturation. **Am. J. Enol. Viticulture.** v.32, n. 4, p. 283 - 289, 1981.

REAZIN, G.H.; BALDWIN, S.; SCALES, H.S.; WASHINGTON, H.W.; ANDREASEN, A.A. Determination of the congeners produced from ethanol during whisky maturation. **J. AOAC**. v.59, n.4, p.770 – 776, 1976.

RILEY, M.; ROSANKE, T.W. Development and validation of analytical methods. **Progress in Pharmaceutical and Bio Medical Analysis**. v.3, p.686 - 694, 1996.

RIZZON, L. A. Vinho e Madeira: íntima relação. **Revista do Vinho**. n.38, p. 04 – 06, 1993.

RUBBIN, R.; RAND, M.L. Alcohol and platelet function. **Alcohol Clinical Experience Research**. V.18, p.105 - 110. 1994.

SALGADO, A. A.; MARQUES, T.A.; ALMEIDA, C.L.F. Madeiras nacionais para envelhecimento natural de aguardente. **Álcool & Açúcar**. n.83, p. 22 - 27, 1996.

SALAGOITYAUGUSTE, M. H.; TRICARD, C.; SUDRAUD, P. Simultaneous determination of aromatic-aldehydes and coumarins by high performance liquid chromatography – Application to wines and brandies stored in oak barrels. **J. Chromatography**, n.392, p. 379 – 387, 1987.

SCHAHINGER, G. The Importance of determining toast levels in oak casks for wine. **The Australian Grapegrower & Winemaker**. n. 8, p. 10 – 11, 1995.

SINDEBEBIDAS – SINDICATO DE BEBIDAS DO ESTADO DO CEARÁ. **A Indústria de bebidas no Estado do Ceará: Histórico e diagnóstico**. Fortaleza: UFC/NODOC, 1992, 201p.

SINGLETON, V.L. Maturation of wines and spirits: Comparison, facts, and hypotheses. **Am. J. Enol. Viticulture**. v.46, n.1, p.98 - 115, 1995.

SPILLMAN, P.J; POLLNITZ, A.P.; LIACOPOULOS, D.; SKOUROUMOUNIS, G.K.; SEFTON, M.A. Accumulation of vanillin during barrel-aged of white, red and model wines. **J. Agric. Food Chem.** v.45, p.2584 - 2589, 1997.

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO G.L.; CARRATURO, A.; FARUOLO C.; MOIO L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **J. Nutr. Biochemistry.** V.1, p.114 - 119, 2000.

TONÉIS & CIA. A arte da Tanoaria. Disponível em <<http://www.toneis.com.br/modules.php?name=News&file=article&sid=50>>. Acesso em: 2 de junho de 2004.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; DAENEN, L.; VERSTREPEN, K.J.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Furfuryl ethyl: Important aging flavor and a new marker for the storage conditions of beer. **J. Agric. Food Chemistry.** v.52, n.6, p.1661 - 1668, 2004.

VASCONCELOS, Y. Cachaça sem mistério. **Pesquisa Fapesp** 2003, 87, 74 - 77.

VIVAS, N.; BOUGEOIS G.; VITRY C. Development of analytical method for the detection of specific biomarkers of wines aging in barrels. **Analysis**, v. 26, n.2. p.88 – 92, 1998.

WINDHOLZ, M. Ed The Merck Index. Rahway: Merck, 1976.

YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana.** Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, (Série Fermentações Industriais, vol. 2). 92p. 1995.