

Perfil físico-químico e quantificação de compostos fenólicos e acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em tonéis de diferentes madeiras

Physico-chemical profile and quantification of phenolic compounds and acrolein in sugar cane spirits stored in casks made of different woods

Wilder Douglas SANTIAGO¹; Maria das Graças CARDOSO²; Lidiany Mendonça ZACARONI³; Jeancarlo Pereira dos ANJOS⁴; Ana Maria de Resende MACHADO⁵; João Guilherme Pereira MENDONÇA⁶

Pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

¹ Mestrando; Universidade Federal de Lavras - UFLA, wildaoquimica@msn.com;

² Autor para correspondência - Doutora e Professora; Universidade Federal de Lavras - UFLA, mcardoso@dqi.ufla.br;

³ Doutoranda; Universidade Federal de Lavras - UFLA, zlidiany@yahoo.com.br;

⁴ Doutorando; Universidade Federal da Bahia - UFBA, jeancarlopanjos@gmail.com;

⁵ Doutora e Professora; Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET, ana.machada@terra.com.br;

⁶ Mestrando, Universidade Federal de Lavras - UFLA, joaouquimica@live.com.

Resumo

A aguardente de cana-de-açúcar, tradicional e popular bebida brasileira, é o destilado mais consumido em nosso País. Estima-se uma produção anual de 1,6 bilhão de litros da bebida, sendo que 90% são provenientes da produção industrial e 10% da artesanal. O hábito de armazenamento está tornando-se uma prática comum entre os produtores, que buscam agregar valores ao seu produto. Madeiras nativas vêm sendo usadas para o armazenamento, substituindo a tradicional madeira de carvalho. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química da bebida e quantificar compostos fenólicos e acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em diferentes madeiras. As análises físico-químicas realizadas foram: teor alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol e cobre. A determinação dos compostos fenólicos e acroleína foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV). Os valores obtidos para os compostos fenólicos variaram de 0,13 a 14,51 mg L⁻¹, observando a predominância de diferentes compostos que dependem da madeira utilizada. A presença do contaminante acroleína nas amostras apresentou valores abaixo do limite estabelecido pela legislação, com exceção de uma amostra que apresentou valores acima do permitido. Das amostras analisadas, 66,6% demonstraram ser bons produtos para comercialização.

Palavras-chave adicionais: Bebida; destilado; cromatografia líquida de alta eficiência.

Abstract

The sugar cane spirit is the most traditional and popular distilled alcoholic beverage in Brazil. The total annual output is of 1.6 billion liters, 90% of which is industrially produced and the remaining 10% is home brewed. The practice of storage is becoming common among producers, who seek to increase the value of their product. Casks made of native woods are being used, replacing the traditional oak wood. Therefore, the present study sought to evaluate the physical and chemical quality of the beverage and to quantify phenolic compounds and acrolein in sugar cane spirits stored in casks made from different woods. The physicochemical analyses to which the spirits were submitted viewed to quantify the following components: alcohol, volatile acidity, esters, aldehydes, higher alcohols, furfural, methanol, and copper. Phenolic compounds and acrolein were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC/UV). Phenolic compounds concentration varied from 0.13 to 14.51 mg L⁻¹. The compounds verified to be predominant depended on the type of wood used to make the cask. Acrolein in the examined samples was verified to occur in levels below the limits established by legislation with the only exception of a sample in which acrolein level was above the established limit. Most of the samples analyzed (66.6%) proved to be good products for commercialization.

Additional keywords: Beverage; distilled; high performance liquid chromatography

Introdução

A aguardente de cana-de-açúcar é uma bebida fermento-destilada, cuja origem vem desde o tempo da escravidão, especificadamente no século XVI. Por ser produzida em todas as regiões do País, a aguardente torna-se diferenciada pelos métodos de produção e pelas características culturais e históricas que caracterizam cada região. É uma bebida genuinamente brasileira, sendo o destilado mais consumido no País. Estima-se uma produção anual de 1,5 bilhão de litros da bebida, sendo que 90% são provenientes da produção industrial e 10% da artesanal (CARDOSO, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa nº 13, de 30 de junho de 2005, aguardente de cana-de-açúcar é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% v/v a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressas em sacarose. A cachaça, entretanto, é definida como sendo toda aguardente de cana-de-açúcar que apresenta graduação alcoólica entre 38 e 48% em volume (MAPA, 2005a).

No processo de envelhecimento de aguardente, ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de compostos provenientes das madeiras utilizadas na confecção dos tonéis, assim como reações entre alguns compostos presentes na bebida, os quais são provenientes de etapas anteriores ao envelhecimento. Tais reações são responsáveis por mudanças químicas, físicas e sensoriais no produto, como, por exemplo, cor, aroma e sabor. A incorporação dos compostos durante o envelhecimento da bebida não depende exclusivamente da espécie de madeira utilizada no armazenamento, mas também do tempo de permanência desta no interior dos tonéis. Devido à grande competitividade da bebida no mercado, o armazenamento desta em barris de madeira tem-se tornado uma prática comum entre os produtores, agregando, assim, maior valor ao produto. Embora a madeira tradicionalmente utilizada para o envelhecimento de bebidas alcoólicas seja o carvalho (*Quercus sp.*), várias madeiras de origem nativa brasileira têm sido utilizadas na confecção de barris e tonéis para o envelhecimento da aguardente, como amendoim (*Pterogyne nitens*), cerejeira (*Amburana cearensis*), cedro (*Cedrela fissilis*), jatobá (*Hymenaeae carbouril*), ipê (*Tabebuia sp*), freijó (*Cordia goeldiana*), garapa (*Apuleia leiocarpa*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), vinhático-amarelo (*Plathynemia foliosa*) e jequitibá (*Carinian legalis*) (CARDOSO, 2006; PARAZZI et al., 2008).

Além dos compostos secundários provenientes de diferentes etapas do processo de

produção da aguardente de cana-de-açúcar, responsáveis pelo sabor e aroma característicos da bebida, e dos compostos agregados a esta após o envelhecimento, alguns contaminantes também podem ser encontrados na cachaça. Entre eles, o 2-propenal (acroleína) destaca-se e desperta interesse aos estudiosos, devido a sua alta toxicidade à saúde humana. Sua quantificação é feita por vários métodos analíticos, sendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a mais empregada (AZEVEDO et al., 2007).

A quantificação dos teores da acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar faz-se necessária visto que a legislação Brasileira estabelece o limite máximo de 5 mg/100 mL de álcool anidro, sendo que acima deste limite a bebida estará imprópria para ser comercializada. Outro fato que deve ser considerado é o pequeno número de estudos relacionados à quantificação de acroleína em aguardente de cana. A maioria dos estudos limita-se à determinação de formaldeído e acetaldeído.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química e quantificar os seguintes compostos fenólicos - ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, cumarina, 4-metilumbeliferona (4-muf), ácido *o*-cumárico e eugenol -, bem como quantificar acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em carvalho (*Quercus sp.*), louro-canela (*Aniba parviflora*), bálsamo (*Myroxylon peruiferum*), castanheira (*Bertholletia excelsa*) e cerejeira (*Amburana cearensis*).

Material e métodos

Amostras

Foram coletadas seis amostras de aguardente de cana-de-açúcar de diferentes produtores dos municípios de Itajubá e Perdões, na região sul do Estado de Minas Gerais, armazenadas em barris de diferentes madeiras e com capacidades distintas. As madeiras utilizadas para o armazenamento das bebidas, com seus respectivos tempos de armazenamento, foram: carvalho [W1 (96 meses) e W3 (8 meses)], louro-canela [W2 (42 meses)], bálsamo [W4 (4 meses)], castanheira [W5 (5 meses)] e cerejeira [W6 (4 meses)].

Padrões e Reagentes

Os padrões utilizados para a análise cromatográfica dos compostos fenólicos foram o ácido gálico, catequina, ácido vanílico, fenol, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, cumarina, 4-metilumbeliferona (4-muf), ácido *o*-cumárico e

eugenol. Todos os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou Acros Organics.

Os reagentes empregados para análise de acroleína foram o padrão de acroleína (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (Merck), etanol absoluto (Merck) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) (Acros Organics). Este último foi previamente purificado por três sucessivas recristalizações com metanol.

Todos os solventes utilizados para cromatografia foram de grau analítico; metanol (Merck), ácido acético glacial (JT Baker), acetoneitrila (JT Baker) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q.

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata no Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente do Departamento de Química/UFLA, de acordo com as metodologias recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2005b). Os parâmetros analisados foram o teor alcoólico, acidez volátil, ésteres, aldeídos, álcoois superiores, furfural, metanol e cobre. As metodologias empregadas para as análises estão descritas a seguir:

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

Acidez volátil: foi determinada por titulação volumétrica de neutralização. Os ácidos voláteis foram extraídos da bebida por arraste de vapor, utilizando o Destilador Eletrônico Enochimico Gibertini. Posteriormente, os ácidos obtidos foram titulados com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ em presença de fenolftaleína a 1% como indicador. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de ácido acético por 100 mL de amostra.

Ésteres: foram determinados pela titulação dos ácidos carboxílicos obtidos por transesterificação dos ésteres presentes nas bebidas. Suas quantidades foram expressas em gramas de acetato de etila por 100 mL de amostra.

Aldeídos: foram analisados pelo método titulométrico direto com iodo 0,05 mol L⁻¹, titulando o SO₂ formado por meio das reações envolvidas na análise. A quantidade de aldeídos presente nas amostras foi expressa em gramas de aldeído acético por 100 mL da amostra.

Álcoois superiores: a quantidade total de álcoois superiores foi determinada por meio de reação colorimétrica e quantificação em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC a 540 nm. As concentrações foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de álcoois superiores diluídos em água/etanol 1:1. A

quantidade total desses compostos foi expressa em miligrama por 100 mL de álcool anidro.

Furfural: a quantificação foi realizada por meio das leituras espectrofotométricas a 520 nm (Shimadzu UV-1601 PC), por comparação das absorvâncias observadas nas amostras da bebida com valores de absorvâncias de uma curva analítica, previamente construída com soluções-padrão de etanol/furfural. Para a análise de furfural, o grau alcoólico do destilado foi corrigido para 50° GL. Os resultados obtidos foram expressos em miligrama de furfural por 100 mL de álcool anidro.

Metanol: a quantificação foi realizada por reações colorimétricas e determinação no espectrofotômetro a 575 nm (Shimadzu UV-1601 PC). As quantidades deste composto foram determinadas por meio da construção de curvas analíticas de solução de etanol/metanol. Os resultados obtidos foram expressos em mL de metanol por 100 mL de álcool anidro.

Cobre: a quantificação do cobre foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas a 546 nm (Shimadzu UV-1601 PC), comparado a valores de absorvância referentes a uma curva analítica previamente construída, utilizando-se de sulfato de cobre como padrão primário. As reações colorimétricas foram realizadas previamente nas amostras de cachaça sem redestilar.

Análises cromatográficas

A determinação dos compostos fenólicos e da acroleína foi realizada utilizando-se da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU-20A₃, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de arranjo de diodos (PDA). A coluna cromatográfica empregada em ambas as análises foi uma coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 µm).

Compostos fenólicos

A metodologia utilizada para a análise dos compostos fenólicos nas amostras de aguardente armazenadas em diferentes tonéis de madeira foi realizada de acordo com aquela descrita por ANJOS et al. (2011). Para os padrões, foram preparadas soluções-estoque com concentração de 1.000 mg L⁻¹ em álcool etílico a 40%.

O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque

previamente preparadas. Nesta solução intermediária, os padrões encontravam-se nas seguintes concentrações: ácido gálico (6,80 mg L⁻¹), catequina (11,61 mg L⁻¹), ácido vanílico (6,73 mg L⁻¹), fenol (3,73 mg L⁻¹), ácido siríngico (7,90 mg L⁻¹), vanilina (6,08 mg L⁻¹), siringaldeído (7,29 mg L⁻¹), ácido *p*-cumárico (6,56 mg L⁻¹), ácido sinápico (8,97 mg L⁻¹), cumarina (5,85 mg L⁻¹), 4-muf (7,05 mg L⁻¹), ácido *o*-cumárico (6,56 mg L⁻¹) e eugenol (6,56 mg L⁻¹).

Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido acético a 2% em água (Solvente A) e metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v/v) (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com o gradiente de 0 a 25 min (00-40% B); 25-40 min (40-55% B); 40-50 min (55-100% B); 50-60 min (100-00% B). O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 µm (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. As injeções dos padrões foram realizadas em triplicata, e as amostras foram injetadas em duplicata, sendo a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra, comparados aos dos padrões.

Acroleína

A metodologia empregada para a quantificação de acroleína baseou-se nas metodologias descritas por NASCIMENTO et al. (1997) & ZACARONI et al. (2011a). Esta consiste na derivação da amostra para posterior análise por CLAE/UV.

Para a preparação da 2,4-dinitrofenilhidrazona de acroleína, 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram adicionados a 0,4 g de 2,4-DNPH, seguida da adição de 3 mL de água destilada, gota a gota, até a solubilização completa. Imediatamente 10 mL de etanol a 95% foram adicionados. Em outro recipiente, dissolveu-se 0,1 g de acroleína em 20 mL de etanol, que foram adicionados à solução preparada anteriormente, deixando a mistura em repouso por 15 min, até a formação de um precipitado. Filtraram-se e recristalizaram-se duas vezes com etanol absoluto. A pureza foi confirmada por determinação da temperatura de fusão e análise elementar (C, H e N) e por CLAE/UV.

A derivação das amostras foi realizada pela adição de 4 mL da amostra e 50 µL de HClO₄, consecutivamente, a 1 mL da solução a 0,4% de 2,4-DNPH em acetonitrila. A solução resultante foi estocada à temperatura ambiente por aproximadamente 45 min e filtrada em membranas de polietileno 0,45 µm (Milipore).

A fase móvel utilizada para a análise cromatográfica foi ácido acético a 2% em água (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com o gradiente 0 a 3 min (70-85% B); 3 a 10 min (85-80% B); 10 a 12 min (80-70% B); 12 a 15 min (70-70% B). A absorvância foi medida a 365 nm, fluxo de 0,9 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

A conversão quantitativa do aldeído nas bebidas destiladas em 2,4-dinitrofenilhidrazona foi garantida pelo excesso de 2,4-DNPH empregado. A quantificação foi realizada utilizando-se do método de padronização externa. A curva analítica foi obtida por sucessivas diluições da solução-estoque (1.000 mg L⁻¹ em acetonitrila) em solução de álcool a 50%, com uma faixa linear de 0,5-10,5 mg L⁻¹. Essa foi obtida por regressão linear, plotando a área do pico versus concentração.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação dos métodos foram estimados utilizando-se dos parâmetros da curva analítica, conforme as equações matemáticas: LD = 3 x (s/S) e LQ = 10 x (s/S), em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão, e S é o coeficiente angular da curva analítica (SNYDER et al., 1997).

Resultados e discussão

Análises físico-químicas

Os resultados das avaliações físico-químicas das aguardentes de cana-de-açúcar estão apresentados na Tabela 1.

Alguns dos compostos analisados podem ser formados durante o período de armazenamento / envelhecimento da aguardente. Destacam-se os ésteres, que são formados por meio da reação entre os álcoois e os ácidos orgânicos presentes na bebida. Tais compostos, juntamente com os álcoois superiores, aldeídos e ácidos, são responsáveis pela formação do sabor e do aroma da mesma, compondo, assim, o chamado *flavour* ou *buquê* da aguardente (PEREIRA et al., 2003). Analisando as concentrações desses compostos, pôde-se notar que a aguardente armazenada em tonel de louro-canela apresentou maior concentração destes, enquanto a amostra armazenada em tonel de castanheira apresentou o menor teor destes congêneres, exceto os aldeídos, para os quais apresentou valor semelhante ao observado para a amostra armazenada em amburana. Além disso, parte desses compostos pode ser proveniente da madeira utilizada no armazenamento da bebida e pelas reações de oxidação ocorridas nas mesmas (ANJOS et al., 2011).

Tabela 1 - Avaliação físico-química das aguardentes de cana-de-açúcar armazenadas em tonéis de diferentes madeiras.* *Physicochemical characteristics of the sugar cane alcoholic beverages stored in casks made of different types of wood.*

Características	Amostra W1	Amostra W2	Amostra W3	Amostra W4	Amostra W5	Amostra W6
Grau alcoólico ¹	36,11 ± 0,1	52,05 ± 0,1	47,38 ± 0,1	39,55 ± 0,4	44,68 ± 0,1	45,42 ± 0,2
Acidez volátil ²	63,54 ± 0,1	67,6 ± 0,1	29,23 ± 0,3	58,02 ± 0,1	27,39 ± 0,1	26,94 ± 0,1
Ésteres ²	26,24 ± 1,4	52,36 ± 1,9	22,50 ± 0,1	22,46 ± 0,1	10,60 ± 1,1	11,08 ± 1,1
Aldeídos ²	10,18 ± 0,3	23,33 ± 0,1	13,90 ± 0,1	13,30 ± 0,2	20,84 ± 0,1	21,88 ± 0,1
Álcoois superiores ²	162,23 ± 0,2	191,32 ± 0,8	131,19 ± 0,7	177,17 ± 0,4	115,26 ± 0,1	116,77 ± 0,4
Furfural ²	2,47 ± 0,1	1,99 ± 0,2	1,07 ± 0,1	0,60 ± 0,1	1,93 ± 0,1	0,56 ± 0,1
Metanol ²	7,56 ± 0,6	11,34 ± 0,5	ND	ND	ND	ND
Cobre ³	0,39 ± 0,1	0,74 ± 0,1	0,08 ± 0,1	0,60 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,18 ± 0,1

*Média ± desvio-padrão (¹ %v/v; ² mg/100 mL de álcool anidro; ³ mg L⁻¹); ND = Não detectado

As concentrações de furfural em todas as amostras apresentaram-se abaixo do limite estabelecido pela legislação, que é de 5 mg/100 mL de álcool anidro. De acordo com que foi descrito por PEREIRA et al. (2003) & MASSON et al. (2007), a formação de furfural ocorre durante a destilação e no armazenamento da aguardente por meio da ação de ácidos sobre as pentoses e seus polímeros (hemiacelulose). No entanto, todas as amostras apresentaram concentrações de furfural dentro dos limites permitidos. A presença desse composto na bebida é indesejável devido à toxicidade que ele apresenta ao organismo humano.

As amostras W1 e W2 apresentaram concentrações de metanol abaixo do limite permitido (20 mg/100 mL de álcool anidro) e não foi detectado nas demais amostras, o que mostrou uma possível preocupação dos produtores quanto à presença de bagacilho no processo fermentativo durante a produção dessas bebidas, levando à não contaminação do produto por esse composto (CARDOSO, 2006).

Um problema comum que preocupa os produtores de aguardente de cana-de-açúcar do Estado de Minas Gerais é o excesso de cobre nas bebidas. A presença deste metal deve-se, principalmente, à dissolução do carbonato básico de cobre [Cu₂(OH)₂CO₃] presente nas paredes internas do alambique, pelos vapores ácidos da bebida. A contaminação pode ser evitada, fazendo-se uma cuidadosa higienização dos alambiques nas safras e entressafras, utilizando-se água e limão na primeira destilação ou utilizando-se de filtros com adsorventes, como o carvão ativado e as resinas de troca iônica (CARDOSO, 2006; LIMA et al., 2009).

Apesar dessa preocupação, as amostras analisadas apresentaram valores abaixo do limite estabelecido pela legislação (5 mg L⁻¹). Trabalhos de CAVALHEIRO e colaboradores (2003) mostraram que o envelhecimento pode reduzir significativamente o teor desse metal na

bebida, representando uma possível alternativa para o controle do excesso desse contaminante na cachaça. Uma provável explicação para a ocorrência desse fato seria a possibilidade de interação dos íons cobre com compostos presentes nas madeiras utilizadas para o armazenamento da bebida.

Compostos fenólicos

A Figura 1 ilustra o cromatograma da solução-padrão dos compostos fenólicos, obtido após injeção de 20 µL, utilizando-se detecção espectrofotométrica. Pode-se observar que os compostos em análise foram bem separados nas condições cromatográficas empregadas.

Na Tabela 2, estão citados os valores obtidos dos parâmetros, coeficientes de determinação das curvas analíticas (a, b e R²) e os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) em mg L⁻¹.

As equações das curvas analíticas foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo todos os padrões. Foram obtidos coeficientes de determinação variando de 0,992 a 0,999, mostrando a forte correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas dos picos, conforme recomendado na literatura (SNYDER et al., 1997).

Os resultados médios obtidos para a quantificação dos compostos fenólicos em aguardentes de cana-de-açúcar, armazenadas em tonéis de diferentes madeiras, estão apresentados na Tabela 3. Valores estatisticamente significativos podem ser observados para os compostos analisados quando comparados nas diferentes madeiras do armazenamento.

De acordo com MIRANDA et al. (2006), alguns fatores podem influenciar na qualidade da bebida no armazenamento, como espécie da madeira, tamanho e pré-tratamento do barril,

condições ambientais, tempo de envelhecimento e teor de álcool da bebida.

A predominância de diferentes compostos fenólicos pode ser observada quanto às espécies de madeiras analisadas. Na aguardente de cana-de-açúcar armazenada em barris de louro-canela (W2), tem-se a predominância de siringaldeído (11,77 mg L⁻¹); em bálsamo (W4),

eugenol (1,14 mg L⁻¹); em castanheira (W5), ácido gálico (1,13 mg L⁻¹), em amburana (W6), 4-muf (14,51 mg L⁻¹). Estudos de ZACARONI et al. (2011b) apresentaram similaridade quanto a alguns compostos majoritários, como eugenol e ácido gálico, nas aguardentes armazenadas em bálsamo e castanheira, respectivamente.

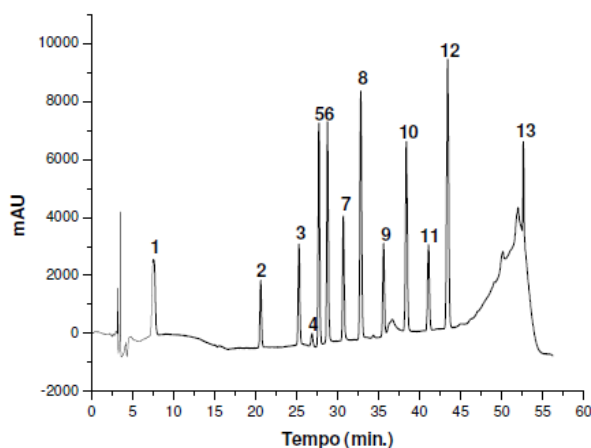


Figura 1 - Cromatograma da solução-padrão de compostos fenólicos, com detecção espectrofotométrica. Identificação dos picos: 1 ($t_R = 8,12$ min) ácido gálico; 2 ($t_R = 22,04$ min) catequina; 3 ($t_R = 27,03$ min) ácido vanílico; 4 ($t_R = 28,67$ min) fenol; 5 ($t_R = 29,63$ min) ácido siríngico; 6 ($t_R = 30,74$ min) vanilina; 7 ($t_R = 32,81$ min) siringaldeído; 8 ($t_R = 35,12$ min) ácido p-cumárico; 9 ($t_R = 38,10$ min) ácido sinápico; 10 ($t_R = 41,04$ min) cumarina; 11 ($t_R = 43,96$ min) 4-muf; 12 ($t_R = 46,46$ min) ácido o-cumárico; 13 ($t_R = 55,97$ min) eugenol. Concentração de cada padrão: $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. *Chromatogram of the standard solution of phenolic compounds with spectrophotometric detection. Peak identification : 1 ($t_R = 8.12$ min) gallic acid; 2 ($t_R = 22.04$ min) catechin; 3 ($t_R = 27.03$ min) vanillic acid; 4 ($t_R = 28.67$ min) phenol; 5 ($t_R = 29.63$ min) syringic acid; 6 ($t_R = 30.74$ min) vanillin; 7 ($t_R = 32.81$) syringaldehyde; 8 ($t_R = 35.12$) p-cumaric acid; 9 ($t_R = 38.10$ min) sinapinic acid; 10 ($t_R = 41.04$ min) coumarin; 11 ($t_R = 43.96$ min) 4- muf; 12 ($t_R = 46.46$ min) o-cumaric acid; 13 ($t_R = 55.97$ min) eugenol. Concentration of each standard : $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹*

Tabela 2 - Parâmetros, coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). * *Parameters, determination coefficients (R^2) of the analytical curves, detection (LD) and quantification (LQ) limits.*

Compostos	B	a	R^2	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	62.575,12	-5.246,32	0,992	0,168	0,561
Catequina	15.036,74	-324,62	0,998	0,099	0,331
Ácido vanílico	38.961,13	-680,05	0,999	0,037	0,124
Fenol	9.993,77	-115,93	0,998	0,037	0,126
Ácido siríngico	67.980,39	-846,47	0,999	0,037	0,123
Vanilina	92.486,88	-1.254,13	0,999	0,053	0,178
Siringaldeído	4.2269,19	-707,19	0,999	0,047	0,158
Ácido p-cumárico	10.6730,17	-1.010,82	0,999	0,042	0,139
Ácido sinápico	29.124,37	-2.988,28	0,993	0,203	0,677
Cumarina	95.761,46	-1.943,73	0,999	0,051	0,168
4-metilumbeliferona	36.837,27	-1.074,17	0,998	0,065	0,216
Ácido o-cumárico	128.591,69	-907,92	0,999	0,031	0,104
Eugenol	20.704,31	-2.032,51	0,992	0,168	0,563

*Regressão linear: $y = bx + a$

As amostras W1 e W3, armazenadas em carvalho, apresentaram o ácido gálico ($1,42 \text{ mg L}^{-1}$; $1,13 \text{ mg L}^{-1}$) e siringaldeído ($1,16 \text{ mg L}^{-1}$; $2,25 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente, como compostos majoritários. A diferença nos teores desses compostos pode estar relacionada ao tempo de armazenamento (W1 = 96 meses e W2 = 8 meses), tempo de uso do barril e condições de armazenamento. Esses resultados corroboram os de MADRERA et al. (2003), que observaram diferenças em relação aos teores e à presença de ácido gálico e derivados do aldeído cinâmico presentes em conhaques, com diferentes tempos de armazenamento. ANJOS et al. (2011), analisando aguardente de cana armazenada em barril de carvalho durante o período de um ano, obtiveram o ácido gálico e siringaldeído como

compostos majoritários. Os mesmos autores observaram, também, alterações em relação ao cheiro e à cor, devido ao armazenamento.

Essas diferenças observadas na composição fenólica da bebida em relação às diferentes madeiras podem ser explicadas pela morfologia da célula, cujas características variam de espécie para espécie. Essa morfologia engloba tamanho de fibra, distribuição de vasos e espessura de parede celular. Dependendo da espécie, esses vasos podem estar obstruídos, impedindo a penetração da bebida e, conseqüentemente, o contato dessa com os extrativos e com as substâncias da parede celular. Assim, causaria diminuição da incorporação dos compostos à bebida (ZACARONI, 2011b).

Tabela 3 - Valores médios da concentração (mg L^{-1}) de compostos fenólicos nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar armazenadas em tonéis de diferentes madeiras. *Mean concentration values (mg L^{-1}) of phenolic compounds in samples of sugar cane alcoholic beverage stored in casks made of different types of wood.*

Compostos	Amostra W1	Amostra W2	Amostra W3	Amostra W4	Amostra W5	Amostra W6
Ácido gálico	$1,42 \pm 0,1^{(a)}$	$5,66 \pm 0,2^{(b)}$	$1,13 \pm 0,01^{(c)}$	<LD	$1,13 \pm 0,1^{(c)}$	<LQ
Catequina	<LQ	<LD	ND	$0,92 \pm 0,1^{(a)}$	<LQ	$1,90 \pm 0,1^{(b)}$
Ácido vanílico	$0,47 \pm 0,1^{(a)}$	$0,83 \pm 0,1^{(b)}$	$0,45 \pm 0,1^{(a)}$	$0,30 \pm 0,1^{(c)}$	$0,12 \pm 0,1^{(d)}$	$0,52 \pm 0,1^{(a)}$
Fenol	$0,56 \pm 0,1^{(a)}$	$0,29 \pm 0,1^{(b)}$	ND	$0,16 \pm 0,1^{(c)}$	$0,32 \pm 0,1^{(b)}$	$0,21 \pm 0,1^{(c)}$
Ácido siríngico	$0,93 \pm 0,1^{(a)}$	$1,37 \pm 0,1^{(b)}$	$1,08 \pm 0,1^{(c)}$	<LD	<LD	<LD
Vanilina	$0,48 \pm 0,1^{(a)}$	$1,31 \pm 0,1^{(b)}$	$0,71 \pm 0,1^{(c)}$	<LQ	<LD	<LQ
Siringaldeído	$1,16 \pm 0,1^{(a)}$	$11,77 \pm 0,4^{(b)}$	$2,25 \pm 0,1^{(c)}$	$0,32 \pm 0,1^{(d)}$	<LQ	$0,64 \pm 0,1^{(e)}$
Ácido p-cumárico	$0,16 \pm 0,1^{(a)}$	$0,90 \pm 0,2^{(b)}$	<LD	<LD	<LD	$0,24 \pm 0,1^{(a)}$
Ácido sinápico	ND	ND	ND	$0,38 \pm 0,1^{(a)}$	$0,14 \pm 0,1^{(b)}$	$0,66 \pm 0,1^{(c)}$
Cumarina	ND	$1,79 \pm 0,1^{(a)}$	ND	<LD	<LD	$0,31 \pm 0,1^{(b)}$
4-muf	ND	<LQ	ND	<LQ	ND	$14,51 \pm 0,3^{(a)}$
Ácido o-cumárico	ND	ND	ND	$0,13 \pm 0,1^{(a)}$	ND	<LQ
Eugenol	<LQ	<LQ	<LQ	$1,14 \pm 0,1^{(a)}$	<LQ	ND

ND = Não detectado; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação. Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente, a 5%, pelo teste de Tukey. *ND = Not detected; LD = limit of detection; LQ = limit of quantification. Means followed by different letters in the same line differs significantly at 5% probability by Tukey's test.*

Acroleína

A Figura 2 ilustra o cromatograma da 2,4-dinitrofenilhidrazona da solução-padrão de acroleína com detecção espectrofotométrica.

O excesso de 2,4-dinitrofenilhidrazina ocasiona a conversão quantitativa dos aldeídos nas bebidas alcoólicas destiladas aos derivados 2,4-DNPHs. A curva analítica foi obtida pela regressão linear ($y = 61.069,06x - 7.812,37$), plotando a área de pico versus concentração. O coeficiente de determinação linear foi igual a 0,999 e os limites de detecção e quantificação foram de 0,28 e $0,93 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

As concentrações de acroleína presentes nas amostras de aguardente de cana anali-

sadas estão apresentadas na Tabela 4. O limite máximo estabelecido pela legislação brasileira quanto ao teor de acroleína para aguardente de cana é de $5 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ álcool anidro. Dos resultados apresentados, podem-se observar concentrações inferiores ao limite estabelecido pela legislação, com exceção da amostra W2.

Observam-se na literatura, poucos relatos sobre a quantificação de acroleína em aguardentes de cana-de-açúcar. NASCIMENTO et al. (1998), analisando 35 amostras de aguardente de cana, encontraram teor médio para acroleína de $0,094 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ de álcool anidro, resultado este inferior aos obtidos neste trabalho. Para AZEVEDO e colaboradores (2007), esse conta-

minante pode ser formado durante o processo de fermentação da bebida, por meio da degradação do glicerol, podendo também estar associado à

presença de bactérias termofermentativas (*Bacillus amaracrylus* e *Lactobacillus colinoides*).

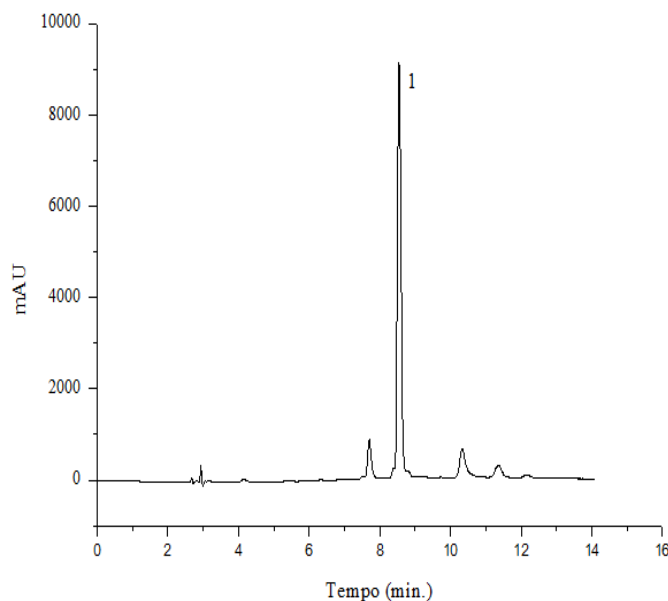


Figura 2 - Cromatograma da solução-padrão de acroleína (1) com $t_R = 9,05$ min. Concentração do padrão: $1,87 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. *Chromatogram of the acrolein standard solution (1) with $t_R = 9.05$ min. Standard concentration : 1.87×10^{-4} mol L⁻¹.*

Tabela 4 - Valores médios da concentração de acroleína nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar analisadas. *Acrolein mean concentration values in sugar cane alcoholic beverage samples.*

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração (mg/100 mL álcool anidro)
W1	4,56 ± 0,1	1,26 ± 0,1
W2	34,20 ± 0,7	6,57 ± 0,1
W3	4,70 ± 0,1	0,99 ± 0,1
W4	<LQ	<LQ
W5	<LQ	<LQ
W6	<LQ	<LQ

* Média ± desvio-padrão; LQ = limite de quantificação. * *Mean ± standard deviation; LQ = limit of quantification.*

Conclusões

Físico-quimicamente, 66,6% das amostras analisadas mostraram-se dentro dos limites de identidade e qualidade estabelecidos pelo MAPA, com exceção das amostras W1 e W2, que apresentaram valores baixos para graduação alcoólica e alto para concentração de acroleína, respectivamente.

De acordo com o método analítico empregado, pode-se inferir que as amostras analisadas apresentam heterogeneidade em relação aos compostos fenólicos analisados. As cachaças armazenadas em carvalho (W1 e W3) apresentaram como compostos majoritários o ácido gálico e siringaldeído; em louro-canela (W2),

predominou o siringaldeído; no bálsamo (W4), o composto majoritário foi o eugenol; na castanha (W5), ácido gálico e, em amburana (W6), 4-metilumbeliferona.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de suporte financeiro à pesquisa, e bolsas concedidas.

Referências

- ANJOS, J. P.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; DOREA, H. S.; SANTIAGO, W. D.; ZACARONI, L. M.; MACHADO, A. M. R.; NELSON, D. L. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during aging in an oak (*Quercus sp.*) barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.22, p.1307-1314, 2011.
- AZEVEDO, L. C.; REIS, M. M.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.8, p.1968-1975, 2007.
- CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana**. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.
- CAVALHEIRO, S. F. L.; SOBRINHO, L. G. A.; FARIA, J. B.; CARDELLO, H. M. A. B. Influência do envelhecimento no teor de cobre em cachaaças. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.21, n.1, p.99-108, 2003.
- LIMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; LIMA, J. M.; NELSON, D. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.4, p.845-848, 2009.
- MADRERA, R. R.; GOMIS, D. B.; ALONSO, J. J. M. Characterization of cider brandy on the basis of aging time. **Journal of Food Science**, v.68, n.6, p.1958-1961, 2003.
- MASSON, J.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R.; ANJOS, J. P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.6, p.1805-1810, 2007.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução normativa n.13: regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**. Brasília, 2005a.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Instrução normativa n.24: manual operacional de bebidas e vinagres**. Brasília, 2005b.
- MIRANDA, M. B.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gamma (60Co) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.772-778, n.4, 2006.
- NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; NETO, B. S. L.; KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D. W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, New York, v.782, p.13-23, 1997.
- NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMANETO B. S.; FRANCO D. W.; FARIA, J. B. Influência do alambique na composição química das aguardentes de cana de açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.735-739, 1998.
- PARAZZI, C.; ARTHUR, C.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.193-199, 2008.
- PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. G.; AZEVEDO, S. M.; MORAIS, A. R.; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.5, p.1068-1075, 2003.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2.ed., New York: J. Wiley, 1997, p.542.
- ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P.; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, São Paulo, v.34, p.320-324, 2011a.
- ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; MORAIS, A. R.; ANJOS, J. P.; MACHADO, A. M. R.; NELSON, D. L. Determination of phenolic compounds and coumarins in sugar cane spirit aged in different species of wood. **Analytical Letters**, Philadelphia, v.44, n.12, p.2061-2073, 2011b.