André Castilho Garcia

**Glicerol e açúcares totais em
aguardentes de cana de açúcar**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

São Carlos

2010

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao alicerce da
minha vida: meus pais Chico e Rute e à
minha irmã Juliana por todo amor,
carinho, incentivo e apoio incondicionais
em todos os momentos.*

EPÍGRAFE

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse trabalho foi uma experiência muito gratificante e engrandecedora, ao mesmo tempo foi também o maior desafio da minha vida. Só foi possível concluir essa etapa graças à ajuda de muitas pessoas, gostaria de deixar aqui o meu “muito obrigado” a algumas delas.

Aos meus pais Chico e Rute pelo amor, confiança, educação, valores e por serem meus heróis.

A Juliana pela companhia e amizade e por me ensinar o verdadeiro valor da palavra irmão.

Ao meu sobrinho Renato por me mostrar a pureza e a inocência em um mundo em que esses atributos são cada vez mais raros.

Aos meus avós e demais familiares pelo carinho e incentivo.

Ao prof. Douglas Wagner Franco, pela paciência, confiança e oportunidades.

Ao prof. Daniel Rodrigues Cardoso, pelos valorosos conselhos.

As amigas Ivonete, Silmara e Veroneide pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do LDQA: Carlão, Eduardo Balinha, Felipão, Fernanda, Itapira, Natália, Papa, Regina, Silvinha e Wandinho pelas discussões, colaboração e amizade.

Ao pessoal da Inorgânica pelos conselhos, amizade e cafezinhos.

Aos meus amigos de Rio Preto Maraíssa e Rodrigo Careca pelos conselhos, companhia e amizade nos bons e maus momentos.

A Camila pelo carinho, amizade e compreensão enquanto estivemos juntos.

Ao Nalbert por me mostrar o valor da amizade.

A todos os meus amigos de Salto, Rio Preto e São Carlos, por estarem sempre ao meu lado, em especial aqueles que moraram comigo durante a graduação.

A todos meus professores, desde o primário até hoje, pela influência e ensinamentos indispensáveis para eu ter chegado até aqui.

A todos os funcionários do IQSC que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a concluir esse trabalho, meu sincero “muito obrigado”!

RESUMO

É consenso entre enólogos que o glicerol contribui para o corpo e sabor adocicado dos vinhos, por analogia, propôs-se investigar a presença e o papel do glicerol em aguardentes de cana. O método adaptado para a quantificação de glicerol, que envolveu a derivatização das amostras com cloreto de benzoíla, uma posterior etapa de extração em fase sólida (SPE) para *clean-up* das amostras e análise via HPLC-DAD, apresentou boa sensibilidade (limites de detecção e quantificação iguais a 0,25 e 0,74 mg L⁻¹, respectivamente), exatidão de 97,5 % e precisão de 93,5 %. A reação de derivatização entre glicerol e o cloreto de benzoíla, estudada por cromatografia líquida hifenada a espectrometria de massas, foi quantitativa com esterificação das três hidroxilas da molécula. Antes de se avaliar a influência do glicerol no sabor doce da cachaça, as concentrações de açúcares totais foram medidas empregando-se o método DNS (limites de detecção e quantificação iguais a 37 e 125 mg L⁻¹, respectivamente). Verificou-se que não houve uma relação entre os teores de glicerol e açúcares totais com a nota doce, determinada a partir de análise sensorial das amostras, para o conjunto de amostras não adoçado. Com base em um teste triangular não houve diferença sensorial significativa entre uma cachaça sem glicerol e outra com glicerol numa concentração de até 35 g L⁻¹. A mediana do teor de glicerol detectado em 51 amostras de cachaça foi de 4,3 mg L⁻¹. A mediana dos teores de açúcares totais para 59 amostras de cachaça não adoçada foi abaixo do limite de quantificação. A mediana dos teores de açúcares totais para 8 amostras de cachaça adoçada foi de 17 g L⁻¹, expressos em glicose.

Palavras-chave: Glicerol, Açúcares Totais, Aguardente de Cana, Sabor Doce.

ABSTRACT

There is a consensus among enologists that glycerol contributes to the body and sweet taste of wine, by analogy; it was proposed to investigate the presence and role of glycerol in sugar cane spirits. The adapted method for glycerol quantification, which involved the samples derivatization with benzoyl chloride, a further solid phase extraction (SPE) step for samples clean-up and analysis by HPLC-DAD showed good sensitivity (limits of detection and quantification of 0.25 and 0.74 mg L⁻¹, respectively), 97.5 % of accuracy and 93.5 % of precision. The derivatization reaction between glycerol and benzoyl chloride, studied through liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry, was quantitative with esterification of the three hydroxyls of the molecule. Before evaluating the influence of glycerol in cachaça's sweet taste, total sugar concentrations were measured by DNS method (limits of detection and quantification were 37 and 125 mg L⁻¹, respectively). It was verified that there was no correlation between the contents of glycerol and total sugars with the sweet score, determined by the samples sensory analysis, to the samples which no sugar was added. Based on a triangular test, there was no significant sensory difference between a cachaça without glycerol and another with glycerol concentration up to 35 g L⁻¹. The median glycerol concentration detected in 51 samples of cachaça was 4.3 mg L⁻¹. The median level of total sugars for 59 samples of cachaça without sugar addition was below the limit of quantification. The median level of total sugar for 8 samples of cachaça with sugar addition was 17 g L⁻¹, expressed as glucose.

Keywords: Glycerol, Total Sugars, Sugar Cane Spirit, Sweet Taste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mercado Nacional de bebidas.....	18
Figura 2 - Principais países importadores de cachaça, em volume.....	20
Figura 3 - Estrutura do glicerol.	22
Figura 4 - Fermentação alcoólica.	22
Figura 5 - Redução da dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato.	23
Figura 6 - Mecanismo de esterificação de um álcool com cloreto de benzoíla nas condições de Schotten-Baumann ^[40]	28
Figura 7 - Esquema e componentes básicos de um ESI-MS. Adaptado de HARRIS, 2005 ^[41]	29
Figura 8 – Fluxograma descritivo das etapas de derivatização e extração em fase sólida das amostras.	37
Figura 9 – Reação entre ácido dinitrossalicílico e glicose.	43
Figura 10 – Cromatogramas típicos de um branco (esquerda) e de uma solução contendo glicerol com concentração aproximada de 11,2 mg L ⁻¹ (direita). tr ~ 23,8 minutos.....	50
Figura 11 – Cromatogramas típicos obtido de uma amostra de cachaça descansada (esquerda) e de uma amostra de cachaça envelhecida (direita).....	51
Figura 12 – Cromatograma de íon total (TIC – Total Ion Chromatogram) obtido de um padrão de glicerol com 20 mg L ⁻¹ de concentração. No detalhe o espectro de massas obtido para o pico eluído entre 22,8 e 24,0 minutos.	53

Figura 13 – Perfil de fragmentação do glicerol derivatizado. O íon de 427,1 m/z $[M + Na]^+$ corresponde a uma molécula de glicerol derivatizado com cloreto de benzoíla ($404,2 \text{ g mol}^{-1}$) formando aduto com um íon sódio. Os íons 283,1 m/z $[M - C_7H_5O_2]^+$ e 105,0 m/z $[M - C_{17}H_{15}O_5]^+$ correspondem a fragmentos do glicerol derivatizado.	54
Figura 14 – (a) Cromatograma obtido de um padrão de glicerol com $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de concentração. (b) Espectro de massas obtido para a fragmentação do íon 427,1 m/z e (c) espectro de massas obtido para a fragmentação do íon 283,1 m/z. Configuração do MS: modo MRM e modo positivo.	55
Figura 15 – (a) Cromatograma de íon extraído (283,1 m/z) obtido de um padrão de glicerol com $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de concentração. (b) Espectro de massas MS/MS/MS (427,1 m/z $\rightarrow$ 283,1 m/z $\rightarrow$).	56
Figura 16 – Cromatograma de íon extraído (283,1 m/z) obtido de uma amostra de cachaça. MS/MS monitorando a transição 427,1 m/z $\rightarrow$ 283 m/z.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de concentração para os componentes do coeficiente de congêneres da aguardente de cana, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ^[4]	17
Tabela 2 - Programação do gradiente de eluição da fase móvel empregado nas análises cromatográficas de glicerol.	39
Tabela 3 - Concentração de glicerol em seis soluções modelo apresentadas ao grupo de 39 avaliadores para o teste de limiar de percepção.....	47
Tabela 4 – Ordem das soluções apresentada aos cinquenta avaliadores no teste triangular.	49
Tabela 5 – Alguns compostos típicos extraídos na etapa de envelhecimento ^[12,60,61] passíveis de serem derivatizados com cloreto de benzoíla.	52
Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação obtidos no presente trabalho em comparação com dados da literatura.	59
Tabela 7 – Concentração de glicerol (em mg L ⁻¹), açúcares totais expressos em glicose (mg L ⁻¹), nota da análise sensorial atribuída ao sabor doce (de 1 a 9) e teor alcoólico (%) das amostras de cachaça. A ordem das amostras apresentada não é a mesma apresentada na seção 3.1.....	61
Tabela 8 – Comparação entre os valores de média, mediana, menor concentração e maior concentração de glicerol encontrados para as amostras de cachaça (em mg L ⁻¹).	64
Tabela 9 – Concentração de glicerol e açúcares totais presentes nos extratos de madeira e na cachaça empregada no preparo destes.	65

Tabela 10 – Concentração de açúcares totais e a conversão do valor médio para sacarose das 20 amostras comerciais de cachaça.....	67
Tabela 11 – Limiares de percepção para o glicerol dos 38 avaliadores, em g L ⁻¹	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Aguardente de cana de açúcar	15
1.1.1. História da aguardente de cana.....	15
1.1.2. Regulamentações da aguardente de cana brasileira.....	16
1.1.3. Mercado.....	18
1.1.4. Características sensoriais.....	20
1.2. Glicerol	21
1.2.1. Definição e origem do glicerol nas bebidas	21
1.2.2. Características sensoriais.....	24
1.3. Técnicas cromatográficas	25
1.3.1. Extração em fase sólida (SPE)	25
1.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	26
1.3.3. Cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas (LC-MS).....	28
1.4. Análise sensorial	30
1.4.1. Teste de limiar de percepção.....	30
1.4.2. Teste triangular	31
2. OBJETIVOS.....	32
3. PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1. Amostras	33
3.2. Reagentes.....	34

3.3. Quantificação do glicerol nas amostras de cachaça	35
3.3.1. Preparo do padrão	35
3.3.2. Preparo das amostras.....	35
3.3.2.A. Derivatização das amostras.....	35
3.3.2.B. Extração em Fase Sólida (SPE).....	36
3.3.2.C. Preparo das amostras para análise via HPLC.....	38
3.3.3. Instrumentação	38
3.3.4. Condições cromatográficas	39
3.3.5. Recuperação	39
3.3.6. Linearidade	40
3.3.7. Limites de detecção e quantificação	41
3.3.8. Exatidão e Precisão	41
3.4. Determinação de açúcares totais nas amostras de cachaça	42
3.4.1. Preparo do reagente DNS	43
3.4.2. Preparo do padrão	43
3.4.3. Preparo das amostras.....	44
3.4.3.A. Hidrólise ácida.....	44
3.4.4.B. Reação com o ácido dinitrossalicílico.....	45
3.4.4. Quantificação de açúcares totais nas amostras de cachaça	45
3.5. Análise sensorial	46
3.5.1. Teste de Limiar de Percepção	47

3.5.2. Teste Triangular.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Derivatização e análise cromatográfica do padrão de glicerol	50
4.2. Análise cromatográfica das amostras de cachaça	51
4.3. Análise cromatográfica hifenada a espectrometria de massas	53
4.4. Recuperação.....	58
4.5. Avaliação do método proposto.....	58
4.6. Determinação de açúcares totais.....	59
4.7. Análise quantitativa de glicerol e de açúcares totais.....	60
4.8. Análise Sensorial	68
4.8.1. Teste de Limiar de Percepção	68
4.8.2. Teste Triangular.....	70
5. CONCLUSÃO.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aguardente de cana de açúcar

1.1.1. História da aguardente de cana

A história da aguardente de cana no Brasil tem início entre os séculos XV e XVI, quando a produção de cana de açúcar foi introduzida por Martim Afonso de Souza na Capitania de São Vicente. A demanda europeia por açúcar, um produto de alto valor comercial, juntamente com o solo fértil e clima quente e úmido do Brasil propiciaram um rápido desenvolvimento da cultura canavieira no país^[1].

A descoberta da aguardente de cana ocorreu ao acaso; a garapa vinda dos engenhos de rapadura ficava ao relento em cochos de madeira onde fermentava com facilidade dando origem a um líquido com cheiro e sabor diferenciados: o “vinho” da cana de açúcar, também conhecido como “garapa azeda da cana”. O caldo azedo, que recebeu o nome de *cagaça*, era dado aos escravos como fonte de alimento para que esses aguentassem a pesada carga de trabalho. Os portugueses, ao provarem a garapa notaram suas propriedades sensoriais positivas e empregaram seus conhecimentos sobre destilação envolvidos no preparo da bagaceira; surgiu assim, do destilado obtido da *cagaça* a bebida chamada de *cachaça*^[1,2].

Com a popularização da nova bebida, o lucro proveniente dos impostos arrecadados sobre o vinho e a bagaceira diminuiu; isso levou a Corte portuguesa a proibir a produção, comercialização e até consumo da *cachaça*. Sem resultados

satisfatórios, a Corte cedeu e revogou as medidas mais radicais, optando por taxar o destilado brasileiro em meados de 1750^[3].

O desenrolar dos anos trouxe melhorias nas técnicas de produção da cachaça, que passou a ser apreciada pelos diversos níveis sociais além de assumir um papel importante no período pré-independência; a cachaça tornara-se um símbolo de democracia, nacionalismo e protesto contra as ordens de Portugal, cujos produtos deixavam de ser consumidos em sinal de patriotismo^[3,4].

Com a Independência do Brasil, a cachaça passa por um período de decadência. A bem intencionada, porém mal planejada abolição da escravidão colocou nas ruas muita gente que após um breve período de festas não tinha mais abrigo nem comida. A cachaça, devido ao seu baixo custo, tornou-se um refúgio para amenizar as dores da miséria e da fome, passando a ser vista pela sociedade como a bebida dos “pinguços” e “cachaceiros”^[4].

A Semana de Arte Moderna de 1922, buscando a identidade da arte, costumes e cultura brasileira, rompeu os preconceitos e possibilitou a valorização da cachaça, devolvendo-lhe o posto de ícone da cultura nacional^[3].

1.1.2. Regulamentações da aguardente de cana brasileira

De acordo com a legislação brasileira^[5], a aguardente de cana de açúcar é a bebida com graduação alcoólica entre 38 e 54 % v/v a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cana de açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana. Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38 e 48 % v/v a 20°C.

Aguardente e cachaça se diferem, portanto, apenas no teor alcoólico; ambas podem conter até 30 g L^{-1} de açúcares expressos em sacarose, sendo obrigatória sua menção no rótulo da bebida quando presente em concentração igual ou superior a 6 g L^{-1} .

O coeficiente de congêneres, ou compostos secundários (correspondentes a aproximadamente 2 % da bebida), não pode ser inferior a 200 mg ou superior a 650 mg por 100 mL de álcool anidro. Tais congêneres, cujos limites de concentração estão expostos na Tabela 1, são responsáveis pelo aroma e sabor peculiares da cachaça^[5]. Os contaminantes, por outro lado, apesar de não terem influência sobre o perfil sensorial da bebida, são deletérios para a saúde, como é o caso do carbamato de etila que apresenta potencial atividade carcinogênica^[6].

Tabela 1 – Limites de concentração para os componentes do coeficiente de congêneres da aguardente de cana, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento^[5].

Produtos Secundários	Concentração Máxima Permitida
Acidez volátil expressa em ácido acético	150 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Ésteres totais, expressos em acetato de etila	200 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural	5 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Soma de Alcoóis Superiores*	360 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Aldeídos totais, em acetaldeído	30 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Contaminantes orgânicos	
Metanol	20 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
Carbamato de Etila	150 µg L ⁻¹
Acroleína (2-propenal)	5 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
2-butanol	10 mg 100 mL ⁻¹ A.A.
1-butanol	3 mg 100 mL ⁻¹ A.A.

Tabela 1 – Continuação.

Contaminantes Inorgânicos	
Cobre	5 mg L ⁻¹
Chumbo	200 µg L ⁻¹
Arsênio	100 µg L ⁻¹

A.A. = Álcool Anidro

*Alcoóis isobutílico, isoamílicos (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol) e n-propílico

1.1.3. Mercado

A aguardente de cana de açúcar ocupa uma posição de destaque no mercado nacional; é a bebida alcoólica mais consumida depois da cerveja (Figura 1). Com uma produção anual oficial estimada em torno de 1,3 bilhões de litros, representa 87 % da produção de bebidas destiladas no país^[7].

Figura 1 - Mercado Nacional de bebidas.

Com aproximadamente 40 mil produtores e quatro mil marcas, a produção de aguardente gera cerca de 650 mil empregos diretos e indiretos e movimenta mais de 600 milhões de dólares anuais^[7,8,9]. Dentre os Estados produtores de aguardente, destacam-se São Paulo, Pernambuco e Ceará, os quais juntos são responsáveis por mais de 65 % da produção de aguardente industrial no país. Os Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e, novamente, São Paulo destacam-se pela produção artesanal de cachaça, sendo os dois primeiros responsáveis por praticamente metade de toda produção nacional de cachaça de alambique^[10].

Apesar dos números expressivos no mercado brasileiro, a exportação de aguardente de cana nunca ultrapassou 2,0 % da produção nacional. Atualmente, são aproximadamente 180 empresas exportadoras abrangendo mais de 55 mercados internacionais. Em 2008 foram exportados aproximadamente 11 milhões de litros de aguardente, responsáveis por uma receita de mais de 16 milhões de dólares. Em relação ao ano de 2007, houve um crescimento de 18 % em valor e 20 % em volume nas exportações da bebida. Dentre os mercados de destino da cachaça (Figura 2) figuram grandes economias como EUA, Alemanha e França^[7].

Figura 2 - Principais países importadores de cachaça, em volume.

1.1.4. Características sensoriais

Muito apreciada por seu sabor e aroma marcantes, a cachaça deve suas características sensoriais peculiares aos processos de fermentação, destilação e envelhecimento em tonéis de madeira^[11].

Das etapas anteriormente citadas, o envelhecimento em tonéis de madeira é o processo mais expressivo para conferir atributos sensoriais positivos à cachaça. Durante o período de maturação, são incorporados à bebida diversos componentes solúveis como flavonóides, taninos e açúcares^[12], além da decomposição parcial de macromoléculas da madeira (lignina, celulose, hemicelulose) em monômeros solúveis^[13]. Além dos compostos incorporados diversas reações químicas ocorrem como, por exemplo, a oxidação de aldeídos oriundos da fermentação e a interação entre ácidos fenólicos e etanol ou outros alcoóis originando ésteres fenólicos^[13].

Além das substâncias incorporadas durante o processo produtivo da cachaça, a legislação permite a adição de açúcar, responsável por amenizar eventuais características sensoriais indesejáveis^[2], como ardência e acidez excessivas, e a adição de caramelo, responsável conferir coloração característica de bebidas envelhecidas em tonéis de madeira^[14].

No entanto, diversas cachaças apresentam sabor adocicado mesmo sem adição de açúcar. Sabe-se que para outras bebidas alcoólicas, não somente os açúcares são responsáveis pelo sabor seu doce; o glicerol é uma das substâncias responsáveis por essa característica. Pretende-se, portanto, avaliar o efeito do glicerol em aguardentes de cana.

1.2. Glicerol

1.2.1. Definição e origem do glicerol nas bebidas

O glicerol (1,2,3-propanotriol) – Figura 3 – é um triálcool de peso molecular 92,09 g mol⁻¹, ponto de fusão 18,17°C e ponto de ebulição 290°C. Trata-se de um líquido higroscópico e viscoso à temperatura ambiente. Presente em todos os animais e vegetais como constituinte de óleos e gorduras (triacilglicerídeos), tem uso bastante difundido em diversas aplicações, como solvente, umectante, plastificante, componente de fármacos, explosivos e alimentos^[15].

Figura 3 - Estrutura do glicerol.

Nas bebidas, o glicerol é formado majoritariamente durante fermentação, etapa na qual a glicose presente no mosto é metabolizada pelas leveduras, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais utilizada nessa função.

As leveduras são microrganismos facultativos, capazes de realizar respiração ou fermentação de acordo com as condições do meio. Durante a fermentação alcoólica (Figura 4), além de etanol e gás carbônico^[16] são originados diversos subprodutos, tais como, ácidos orgânicos^[17,18], ésteres^[19] e glicerol, sendo este último a substância de maior abundância depois do etanol e do gás carbônico^[20].

Figura 4 - Fermentação alcoólica.

Durante o processo fermentativo, as leveduras são expostas a diversas condições de stress como temperatura elevada, pH, alta concentração de açúcares e acúmulo de etanol no meio. Tais condições alteram a dinâmica biológica das leveduras em nível genético, protéico e metabólico, desregulando suas funções celulares^[21].

O glicerol é produzido visando manter o equilíbrio redox e a osmorregulação das células^[22,23]. O stress osmótico induz a produção de três codificadores de proteína (*GPD1*, *GPP1* e *GPP2*), enquanto que para manter o equilíbrio redox da célula, é induzida a produção de *GPD2* e *GPP1*. O glicerol é produzido a partir da dihidroxiacetona fosfato (DHAP), um intermediário de três carbonos da via glicolítica, em um processo de duas etapas: a glicerol-3-fosfato desidrogenase, codificada pela *GPD1* e *GPD2*, catalisa a redução da DHAP a glicerol-3-fosfato (Figura 5). A glicerol-3-fosfatase (GPP), codificada pela *GPP1* e *GPP2*, subsequentemente desfosforila o intermediário resultante, dando origem ao glicerol^[23,24].

Figura 5 - Redução da dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato.

1.2.2. Características sensoriais

O glicerol é o terceiro constituinte mais abundante em vinhos; os únicos compostos que superam sua concentração nessas bebidas são a água e o etanol^[25]. Em vinhos produzidos no estado da Califórnia (EUA) foram obtidas concentrações de glicerol entre 1,86 e 7,53 g L⁻¹, em australianos teores de até 9,94 g L⁻¹, em alemães e franceses concentrações entre 14,6 e 24,7 g L⁻¹^[26].

Enólogos sugerem, praticamente em consenso, que o glicerol tem implicações sensoriais positivas importantes em vinhos^[26,27,28]. Sua principal contribuição diz respeito ao “corpo” da bebida, mais especificamente à “textura”, “flexibilidade” e “persistência”^[27], porém em concentrações mais elevadas também contribui para o sabor doce da bebida^[25,26,27,28]. Apesar da contribuição sensorial para os vinhos, mais especificamente ao paladar, a variação da concentração de glicerol não demonstrou nenhuma mudança significativa no aroma dessas bebidas^[25].

Considerando os efeitos sensoriais positivos do glicerol para os vinhos, diversos países fazem uso da adição da substância para mascarar eventuais defeitos nas bebidas, por esse motivo seu monitoramento tem sido feito como forma de controle de qualidade^[29].

Em decorrência do elevado ponto de ebulição do glicerol (290°), são encontradas concentrações diminutas desse composto em bebidas alcoólicas destiladas em relação a bebidas fermentadas, como o vinho^[30,31]. Essa presença se deve, muito provavelmente, devido ao arraste a vapor, problemas durante a etapa de destilação da bebida ou adição proposital para mascarar eventuais defeitos sensoriais^[30,31].

Dentre os métodos utilizados para a quantificação de glicerol, a cromatografia líquida se destaca pela versatilidade, sendo utilizada tanto para análise de alimentos e bebidas^[29,30], quanto para análises biológicas^[33,34].

1.3. Técnicas cromatográficas

1.3.1. Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction) é uma técnica de separação líquido-sólido cujos princípios baseiam-se nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão ou cromatografia clássica^[34,35]. A SPE consiste de uma pequena coluna aberta (cartucho de extração), a qual contém a fase sólida (fase estacionária) por onde passa a amostra contendo o(s) analito(s) de interesse.

Em comparação com outros métodos de extração, como a extração líquido-líquido, por exemplo, a SPE é vantajosa em diversos aspectos: requer menor número de etapas de manipulação da amostra, menores volumes de solvente, o tempo total para extração é reduzido, além de poder ser automatizada e permitir a extração de diversas amostras ao mesmo tempo^[35,36].

Dentre as principais aplicações para a SPE destacam-se a concentração (enriquecimento) e isolamento do analito (*clean-up*). O enriquecimento tem como objetivo concentrar o analito através da passagem de um grande volume de amostra pelo cartucho; o analito aprisionado no cartucho é então eluído por uma pequena quantidade de solvente, de forma que o analito coletado esteja bem mais

concentrado que na amostra original. O *clean-up* não tem como objetivo principal a concentração do analito, mas, sim, o isolamento deste dos interferentes presentes na matriz. É importante salientar que ambos os procedimentos não são excludentes, podendo haver numa mesma etapa de extração a concentração e o isolamento do analito de interesse^[35].

O método adaptado para quantificação de glicerol descrito no presente trabalho utiliza-se de um processo de derivatização e exige uma etapa de *clean-up* com SPE para remoção do excesso de reagentes, os quais interferem na análise cromatográfica.

1.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através da primeira. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes^[37,38]. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utiliza pressões elevadas (da ordem de 2500 psi) para forçar a passagem do solvente (fase móvel) através de colunas que contém partículas muito finas (fase estacionária) capazes de proporcionar separações muito eficientes (alta resolução)^[39].

A separação dos componentes numa amostra é apenas uma parte da cromatografia, os outros objetivos da técnica (identificação e quantificação dos

analitos) somente são atingidos com o uso de um detector adequado. Dentre os principais tipos de detectores disponíveis para HPLC estão o espectrofotométrico (UV-vis), índice de refração, evaporativo com espalhamento de luz, eletroquímico, fluorescência, condutividade e espectrômetro de massas.

O detector espectrofotométrico (UV-vis) é o mais comum, pois uma gama muito grande de analitos absorve radiação na região do ultravioleta/visível. Apesar da grande versatilidade desse tipo de detector, nem todas as amostras são adequadas para esse tipo de análise, por não apresentarem grupos cromóforos em sua estrutura. O procedimento chamado de derivatização visa contornar problemas como esse.

A derivatização, em poucas palavras, consiste em se adicionar um grupo ou alterar parte de uma molécula de forma que ela possa ser detectada convenientemente; grupos fluorescentes ou eletroativos podem ser ligados covalentemente a um analito de interesse para que esse seja detectado por um detector de fluorescência ou eletroquímico, por exemplo^[39].

A benzoilação^[40,41] tem sido empregada na derivatização de compostos que apresentam grupos funcionais –OH (alcoóis primários, fenóis e carboidratos) e –NH₂ (aminas primárias e aminoácidos), por originar produtos que absorvem no ultravioleta. A reação (Figura 6) de esterificação de moléculas que contenham grupos hidroxila com cloreto de benzoíla ocorre sob as condições de Schotten-Baumann, em meio fortemente básico, visando consumir prontamente o ácido clorídrico formado para deslocar o equilíbrio da reação no sentido dos produtos^[40,42].

Figura 6 - Mecanismo de esterificação de um álcool com cloreto de benzoíla nas condições de Schotten-Baumann^[43].

1.3.3. Cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas (LC-MS)

A espectrometria de massas (MS) é muito utilizada como detector cromatográfico, pois permite a obtenção de informações tanto qualitativas quanto quantitativas. O espectrômetro de massas pode ser altamente seletivo ao analito de interesse. Esta seletividade diminui a razão sinal/ruído e minimiza as exigências no preparo da amostra e/ou a necessidade da separação cromatográfica completa dos constituintes presentes em uma mistura^[44].

A grande dificuldade de se acoplar a cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas ocorre porque as duas técnicas são antagônicas: enquanto a espectrometria de massas opera em alto vácuo para evitar colisões moleculares durante a aceleração dos íons, a HPLC é uma técnica que utiliza pressões elevadas. O problema, portanto, é a remoção da grande quantidade de matéria presente entre o cromatógrafo e o espectrômetro. Um dos métodos mais utilizados para transferir as fases líquidas eluídas do cromatógrafo para o espectrômetro é a ionização por electrospray (ESI)^[44].

Embora seja considerada uma fonte de ionização, o “electrospray” é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existente em solução para a fase gasosa. A fase líquida proveniente da coluna cromatográfica entra em um

Introdução

capilar de aço juntamente com um fluxo coaxial de N_2 , onde ocorre a nebulização da mesma. Entre o capilar de aço e a câmara de nebulização, a qual se mantém a pressão ambiente, é estabelecida uma grande diferença de potencial que, juntamente com o fluxo coaxial de N_2 produz um fino aerossol de partículas carregadas. Sob influência de uma diferença de potencial ainda maior, os íons que vaporizam a partir das gotículas do aerossol são atraídos em direção a um capilar de vidro, fluindo em direção ao analisador de íons (quadrupolo, ion trap, time of flight (TOF), dentre outros) e posteriormente ao detector (multiplicador de elétrons); a cada estágio por onde os íons passam, a pressão se torna cada vez menor^[44,45,46]. A Figura 7 ilustra esquematicamente um espectrômetro de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).

Figura 7 - Esquema e componentes básicos de um ESI-MS. Adaptado de HARRIS, 2005^[44].

1.4. Análise sensorial

A análise sensorial é uma área da ciência que aplica métodos de análise estatística para evocar, medir, analisar e interpretar o uso dos sentidos humanos (visão, olfato, paladar, tato e audição) na avaliação de alimentos e produtos de consumo^[47,48]. As aplicações da análise sensorial são diversas, indo desde o controle de qualidade do processo produtivo a aceitação de determinado produto no mercado.

Existem diversos testes^[47,48] para avaliação sensorial de bebidas e alimentos, no presente trabalho foram utilizados testes de diferença e sensibilidade.

1.4.1. Teste de limiar de percepção

O teste de limiar (ou limite) de percepção é um teste de sensibilidade, cujo objetivo é determinar o limite mínimo de concentração em que o avaliador pode perceber um determinado estímulo (*threshold*)^[47].

O teste consiste em apresentar aos analistas uma série com concentrações crescentes do analito de interesse e estes devem indicar se algum estímulo é detectado. O *threshold* individual de cada analista corresponde à concentração mais baixa na qual é percebido algum estímulo. O *threshold* do grupo é a média geométrica dos limiares de todos os indivíduos.

1.4.2. Teste triangular

O teste triangular é um teste de diferenciação cujo objetivo é verificar se existe diferença significativa entre duas amostras diferentes^[47,49].

O teste consiste em apresentar aos avaliadores três amostras codificadas, informando-os que destas amostras apresentadas, duas são iguais e uma diferente. O objetivo dos avaliadores é tentar identificar a amostra diferente. As amostras devem ser servidas em todas as combinações possíveis: A A B / A B A / B A A / B B A / B A B / A B B. Com os resultados obtidos, realiza-se um teste do qui-quadrado para verificar se a amostra é, em determinado nível de confiança, estatisticamente diferente das demais^[47,49].

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo procurar compreender melhor as razões do sabor adocicado de algumas aguardentes de cana. Para tanto pretende-se conhecer o perfil químico quantitativo de glicerol e de açúcares totais em amostras comerciais de cachaça. Também pretende-se verificar se, para as bebidas não adoçadas, existe correlação entre os teores de glicerol e os resultados da análise sensorial desse mesmo conjunto de amostras.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Amostras

O conjunto de amostras estudado no presente trabalho foi composto de 71 cachaças oriundas de diversos Estados do Brasil, destas 34 descansadas e 37 envelhecidas:

Santa Cachaça^E – MG, Engenho da Vertente^E – SP, Sirigaita do Canário^D – SP, Sirigaita do Canário^E – SP, Bandeirantes^D – SP, Bandeirantes^E – SP, Engenho Doce^E – MG, Empório da Cana^D – SP, Cachaça da Torre^E – SP, Embaúba^E – MG, Jacuhy^E – MG, Mirahy^E – MG, Volúpia^D – PB, Volúpia^E – PB, Ginga Brasil Prata^D – SP, Ginga Brasil Ouro^E – SP, Elisa Airosa Prata^D – SP, Elisa Airosa Ouro^E – SP, Elisa Extra Premium^E – SP, Tiquara^E – SP, São Saruê^D – PE, São Saruê^E – PE, Magnífica^E – RJ, Fogosa^E – MG, Campanari^D – SP, Campanari^E – SP, Verde Amarela^D – MG, Verde Amarela^E – MG, Profana^D – SP, Profana^E – SP, Chora Menina^D – SP, Chora Menina^E – SP, Vila Bela^E – MG, Dedo de Prosa Carvalho^E – MG, Dedo de Prosa Louro Canela^E – MG, Estação de Minas^E – SP, Cachaça do Mestre^E – SP, Germana^D – MG, Germana^E – MG, Aroma do Caraça^E – MG, Poesia^D – MG, Dona Carolina^E – SP, Paraitinga^E – SP, Mazzaropi^E – SP, Barril 12^E – GO, Papo^D – SP, Solar do Engenho^D – MG, Solar do Engenho^E – MG, Dose Clássica^D – ES, Mazzaropi^D – SP, Mulata^D – SP, Canarinha^E – MG, Cachaça 51^D – SP, Velho Barreiro^D – SP, Ypióca Prata^D – CE, Arara^D – SP, Famosa Caninha de Luiz Alves^D – SC, Pitú^D – PB, Caninha 21^D – SP, Velho Barreiro Gold^E – SP, Pé de Serra^D – AL, Caninha da Roça^D – SP, Bossa Club^D – SP, Gabriela^D – SP, Tietê^D – SP, Fuzarca de Minas^E – MG, Samba & Cana^D – MG, Thara^D – SP, Itaguaçu^D – SP, D. Beja^D – MG e

Branquinha de Minas^E – SP. Os sobrescritos “D” e “E” se referem às amostras descansadas e envelhecidas respectivamente.

Além das amostras de cachaça, trabalhou-se com quinze extratos de madeira – 5 amostras de carvalho, 2 amostras de amburana, 2 amostras de jatobá, 2 amostras de jequitibá branco, 2 amostras de canela sassafrás e 2 amostras de amendoim. Para o preparo dos extratos, pesou-se 30 mg de cada tipo de madeira, que foram trituradas em partículas de 100 ± 20 mesh, aos quais se adicionou 30 mL de uma cachaça não envelhecida cujas concentrações quantificadas de glicerol e açúcares totais foram inferiores ao limites de detecção dos métodos propostos no presente trabalho. As amostras foram mantidas em agitação durante vinte e seis dias a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e protegidas da iluminação. Após o período de agitação, filtraram-se os extratos a fim de se remover o material sólido.

3.2. Reagentes

O padrão de glicerol utilizado para as análises foi de pureza cromatográfica (≥ 99 %) (Sigma-Aldrich, EUA). Os solventes utilizados foram acetonitrila, etanol, 2-propanol (J. T. Baker, EUA) e diclorometano (Tedia, EUA), todos de pureza cromatográfica. A água utilizada foi previamente destilada e deionizada por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). O cloreto de benzoíla, empregado na derivatização das amostras, foi grau p. a. ($\geq 99,5$ %) (Fluka, Reino Unido).

3.3. Quantificação do glicerol nas amostras de cachaça

A metodologia empregada na quantificação do glicerol nas amostras de cachaça foi adaptada de MIYAGI *et al.*, 2007^[50], de acordo com as necessidades e objetivos propostos pelo presente trabalho. Os cartuchos de SPE empregados no trabalho citado eram de fase estacionária C8, os cartuchos empregados no presente trabalho foram de fase estacionária C18, por esse motivo utilizaram-se diferentes solventes na etapa de eluição das amostras do cartucho de SPE. O gradiente empregado na separação cromatográfica foi distinto do descrito por MIYAGI *et al.*, 2007^[50], pois os analitos de interesse dos trabalhos foram diferentes sendo, porém, da mesma classe de compostos.

3.3.1. Preparo do padrão

A solução estoque foi preparada a partir da dissolução de 28,0 mg de glicerol em 50 mL de água deionizada. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição da solução estoque, na concentração de aproximadamente $11,2 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar.

3.3.2. Preparo das amostras

3.3.2.A. Derivatização das amostras

Alíquotas de 5 mL das amostras foram levadas a secar e posteriormente reconstituídas com 3 mL de água deionizada. Em quatro frascos de 2 mL, foram

adicionados 600 μL da amostra reconstituída, 180 μL de hidrogenofosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $1,00 \text{ mol L}^{-1}$, 45 μL de cloreto de benzoíla, 135 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 8 mol L^{-1} . Os frascos foram agitados vigorosamente em um agitador de vortex modelo Lab Dancer (IKA, Alemanha) por 70 segundos e mantidos em repouso por 20 minutos a fim de se processar a reação. Após o período de repouso, foram adicionado aos quatro frascos de 2 mL 135 μL de ácido fosfórico (H_2PO_4) 16 %, que foram agitados vigorosamente (Lab Dancer) por aproximadamente 10 segundos.

3.3.2.B. Extração em Fase Sólida (SPE)

Antes da análise cromatográfica, as amostras derivatizadas foram submetidas à SPE para *clean-up* em virtude do excesso de reagentes utilizados para a derivatização do glicerol. Os cartuchos de SPE (Agilent, EUA) de 500 mg de fase estacionaria C18 foram conectados à um sistema de vácuo Visiprep (Supelco, EUA).

Cada cartucho de SPE foi inicialmente condicionado com 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água deionizada a um fluxo de aproximadamente 2 mL min^{-1} . Depois do condicionamento do cartucho, transferiu-se todo material dos quatro frascos de 2 mL, onde a reação de derivatização das amostras foi processada. As amostras percolaram o cartucho um fluxo de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Após a secura, foram adicionados 5 mL de água deionizada para *clean-up* da amostra e então a amostra foi coletada eluindo-se 5 mL de diclorometano através do cartucho.

As etapas de derivatização e extração em fase sólida das amostras estão resumidas no fluxograma da Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma descritivo das etapas de derivatização e extração em fase sólida das amostras.

3.3.2.C. Preparo das amostras para análise via HPLC

As amostras eluídas com diclorometano foram submetidas à secagem sob fluxo de N₂ e então reconstituídas em 2,4 mL de 2-propanol e agitadas vigorosamente (Lab Dancer) até total dissolução do material seco. As amostras foram então filtradas através de uma membrana de 0,45 µm de teflon (PALL, EUA) antes da injeção no cromatógrafo.

3.3.3. Instrumentação

As análises quantitativas de glicerol foram efetuadas por adição de padrão, por meio de um cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão), equipado com duas bombas modelo LC-10AD (Shimadzu, Japão), uma válvula de injeção Rheodyne modelo 7725i com loop de injeção de 20 µL. A detecção das amostras foi feita com um detector SPD-M6A de ultra-violeta com arranjo de fotodiodos (Shimadzu, Japão) ajustado para o comprimento de onda de 230 nm.

A extensão da reação de derivatização das amostras foi avaliada com experimentos conduzidos em LC-MS/MS. O cromatógrafo utilizado foi do mesmo modelo descrito anteriormente; o detector empregado foi um espectrômetro de massas Esquire 4000 (Bruker, Alemanha) com ionização por electrospray. Primeiramente os experimentos foram realizados em varredura com modo de detecção positivo. Posteriormente foram realizados experimentos em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring – Monitoramento de Múltiplas Reações), a fim de se monitorar os principais íons observados nos experimentos em modo varredura.

3.3.4. Condições cromatográficas

A coluna cromatográfica utilizada na separação do glicerol foi de fase reversa C18 Shim-pack (Shimadzu) de 25 cm x 2 mm com partículas de 5 μm de tamanho, acoplada a um pré-coluna GVP-ODS (Shimadzu) de 5 cm x 2 mm d.i..

A fase móvel empregada na análise foi composta de água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B). A eluição da fase móvel foi feita em modo gradiente, com fluxo de 0,4 mL min⁻¹. A Tabela 2 ilustra a programação do gradiente de eluição da fase móvel empregada nas análises.

Tabela 2 - Programação do gradiente de eluição da fase móvel empregado nas análises cromatográficas de glicerol.

Tempo (minutos)	% Solvente B (Acetonitrila)
0,1 – 15	40
15 – 20	80
20 – 27	80
27 – 32	40
32 – 40	40

3.3.5. Recuperação

Para os testes de recuperação do método foram utilizadas cinco soluções modelo de etanol/água (4:6 v/v), as quais foram fortificadas com aproximadamente 6,72 mg L⁻¹ de glicerol. Estas amostras foram submetidas a todas as etapas do preparo de amostra (descritas nas seções 3.3.2.A a 3.3.2.C) e quantificadas de

modo que a recuperação, expressa em porcentagem, foi determinada a partir da equação (1).

$$Recuperação = \frac{C \times 100}{C_{real}} \quad (1)$$

Onde C à concentração encontrada, dada em mg L^{-1} , C_{real} à concentração da solução modelo, também dada em mg L^{-1} .

3.3.6. Linearidade

A linearidade do método, que expressa a resposta do detector obtida em função da concentração do analito^[51,52], a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda que a curva obtida apresente um coeficiente de correlação superior a 0,99^[52]. No presente trabalho, a linearidade foi avaliada em duplicata pela análise cromatográfica das soluções diluídas do padrão de glicerol derivatizado. A partir de diluições sucessivas da solução de trabalho derivatizada de glicerol ($11,2 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$), foram preparadas seis soluções de concentrações decrescentes de glicerol ($84,0 \text{ mg L}^{-1}$, $61,6 \text{ mg L}^{-1}$, $39,2 \text{ mg L}^{-1}$, $20,7 \text{ mg L}^{-1}$, $10,1 \text{ mg L}^{-1}$ e $56,0 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$). Obtiveram-se as áreas das bandas referentes aos padrões que foram relacionadas aos valores de concentração através de um gráfico de regressão linear (curva analítica); a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r^2) obtido.

3.3.7. Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (L.Q.) expressa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada em uma amostra real, enquanto que o limite de detecção (L.D.) representa a menor concentração de um analito que pode ser detectada em uma amostra^[51].

No presente trabalho, os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente, através da análise cromatográfica da solução de trabalho de glicerol derivatizada diluída sucessivamente, até que a relação sinal-ruído da banda cromatográfica referente ao glicerol fosse igual a 10:1 para o L.Q., e de 3:1 para o L.D..

3.3.8. Exatidão e Precisão

A exatidão de um método representa a concordância entre o resultado obtido em um ensaio com o valor de referência aceito como verdadeiro^[53]. No presente trabalho, a exatidão (determinada pela equação 2) foi avaliada por meio da reprodutibilidade na análise de cinco soluções modelo (soluções alcoólicas – 40 % v/v), previamente fortificadas com padrão de glicerol e submetidas a todo procedimento de preparo de amostra e análise cromatográfica.

$$Exatidão = \left[1 - \left(\frac{V_r - V_d}{V_r} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde V_r corresponde ao valor real esperado e V_d ao valor médio encontrado nas cinco injeções das soluções modelo.

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões^[53]. No presente trabalho, a precisão foi avaliada por meio da estimativa do desvio padrão relativo (RSD – Relative Standard Deviation), calculada a partir das equações 3 e 4 com os resultados encontrados nas cinco injeções das soluções modelo.

$$S = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

$$RSD(\%) = 100 - \left(\frac{S}{\bar{x}} \times 100 \right) \quad (4)$$

Onde S corresponde ao desvio padrão absoluto, x_i a concentração de uma medida individual, $\bar{x}$ a média de medições, n ao número de medições e RSD ao desvio padrão relativo, expresso em porcentagem.

3.4. Determinação de açúcares totais nas amostras de cachaça

Em virtude da omissão da legislação vigente, que não exige menção no rótulo da bebida informações sobre a concentração de açúcar adicionado e considerando-se que o objetivo do presente trabalho é avaliar a influencia do glicerol no sabor adocicado das bebidas, a determinação de açúcares totais se fez necessária.

A metodologia empregada na quantificação de açúcares totais nas amostras de cachaça foi adaptada de MILLER 1959^[54].

O presente método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (DNS) ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar redutor é oxidado a ácido carboxílico, com desenvolvimento de coloração avermelhada^[55], conforme a Figura 9 que ilustra a reação entre o ácido dinitrossalicílico e a glicose.

Figura 9 – Reação entre ácido dinitrossalicílico e glicose.

3.4.1. Preparo do reagente DNS

Em um balão volumétrico de 500 mL contendo aproximadamente 300 mL de água deionizada, foram dissolvidos 5,00 g de hidróxido de sódio, 96,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 5,00 g de ácido dinitrossalicílico, todos adicionados lentamente. Após a dissolução total dos reagentes, o balão volumétrico foi preenchido até o menisco com água deionizada. A solução foi estocada em frasco âmbar à temperatura ambiente e na ausência de luz.

3.4.2. Preparo do padrão

A solução estoque foi preparada a partir da adição de 1,0 g de glicose em 50 mL de água deionizada. Para construção da curva de calibração, dilui-se sucessivamente a solução estoque nas seguintes concentrações: 0,0 g L⁻¹,

$1,0 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$, $1,0 \text{ g L}^{-1}$, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ – correspondentes a $0,0 \text{ mol L}^{-1}$, $5,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $28 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $83 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $11 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.3. Preparo das amostras

3.4.3.A. Hidrólise ácida

O método DNS^[54] quantifica apenas os açúcares redutores, por esse motivo é necessário hidrolisar os açúcares não redutores para que os açúcares totais presentes nas amostras possam ser quantificados. A equação 5 ilustra a reação de hidrólise da sacarose.

O procedimento para hidrólise ácida das amostras foi adaptado do Método 08 – Açúcares Totais do Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA^[56]. Aliquotas de 1 mL das amostras foram colocadas em frascos de 5 mL com boa vedação quanto tampados, para evitar perda de volume por evaporação. Para a hidrólise ácida da sacarose, adicionou-se 20 μL de ácido clorídrico concentrado (37 %) às amostras, que foram mantidas a aproximadamente 70 °C em banho -maria durante 20 minutos. Posteriormente as amostras foram colocadas em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 30 μL de solução de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} .

3.4.3.B. Reação com o ácido dinitrossalicílico

No mesmo frasco em que se realizou a hidrólise ácida, foram adicionados 2 mL do reagente DNS às amostras hidrolisadas (ou padrões) que foram mantidas a aproximadamente 100°C em banho-maria (silicone) durante 15 minutos para se processar a reação. Em seguida as amostras foram colocadas em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. Em um balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 2 mL das amostras e então o balão foi preenchido até o menisco com água deionizada.

3.4.4. Quantificação de açúcares totais nas amostras de cachaça

A leitura de absorbância das amostras foi efetuada num espectrofotômetro HP 8452A ajustado para o comprimento de onda de 540 nm. A quantificação das amostras foi feita por comparação com a curva analítica de absorbância versus concentração.

Os limites de detecção e quantificação foram estatisticamente estimados a partir das equações 6 e 7.

$$Abs_{L.D.} = Abs_{br} + 3s \quad (6)$$

$$Abs_{L.Q.} = Abs_{br} + 10s \quad (7)$$

Onde $Abs_{L.D.}$ corresponde à absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de detecção, $Abs_{L.Q.}$ corresponde à absorbância do analito cuja concentração é igual ao limite de detecção, $Abs_{br.}$ corresponde à absorbância do branco e s corresponde ao desvio padrão da curva analítica^[57].

Para a avaliação da hidrólise ácida, foram preparadas quatro soluções com concentrações diferentes de sacarose (A- $0,25 \text{ g L}^{-1}$, B- $0,51 \text{ g L}^{-1}$, C- $0,76 \text{ g L}^{-1}$ e D- $1,0 \text{ g L}^{-1}$, correspondentes a A- $7,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, B- $15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, C- $22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e D- $30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), que foram submetidas aos procedimentos descritos anteriormente.

Avaliou-se também a influência do etanol nas amostras na quantificação de açúcares totais. Foram preparadas quatro soluções: duas soluções de glicose com concentração aproximada de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ($66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), uma preparada em meio aquoso e a outra em etanol/água (4:6 v/v) (Soluções A' e B', respectivamente) e duas soluções de sacarose com concentração aproximada de $5,8 \times 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ($17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), uma preparada em meio aquoso e a outra em etanol/água (4:6 v/v) (Soluções C' e D', respectivamente), que foram submetidas aos procedimentos de hidrólise ácida (Soluções C' e D' somente) e reação com DNS (Soluções A', B', C' e D').

3.5. Análise sensorial

Para avaliar a contribuição organoléptica do glicerol, foram realizados testes sensoriais envolvendo tanto o conjunto de amostras reais quanto soluções modelo com diferentes concentrações de glicerol (Tabela 3).

A avaliação sensorial e hedônica das 50 amostras de cachaça (realizada pelo grupo do LDQA durante o VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages) utilizou dois níveis diferentes de avaliação: avaliação sensorial de descritores quantitativos e qualitativos por parte de um painel de treze especialistas treinados e a avaliação da preferência global por parte dos consumidores, duzentos

e quarenta no total. Os testes foram realizados em salas apropriadas do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP) seguindo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas^[48]. As amostras foram codificadas, apresentadas de forma equitativa, em temperatura ambiente e em taças transparente tipo ISO^[11]. No presente trabalho foram utilizados os descritores quantitativos avaliados apenas pelo painel de especialistas.

3.5.1. Teste de Limiar de Percepção

Foram preparadas seis soluções modelo (a partir de uma cachaça com concentração de glicerol abaixo do limite de detecção) com concentrações crescentes de glicerol, conforme a Tabela 3 e estas foram avaliadas por um grupo de 38 avaliadores, destes 21 do sexo feminino e 17 do sexo masculino, todos com nível médio completo e com idade entre 20 e 30 anos.

Tabela 3 - Concentração de glicerol em seis soluções modelo apresentadas ao grupo de 39 avaliadores para o teste de limiar de percepção.

Solução Modelo	Concentração de glicerol em g L ⁻¹
1	0,0
2	0,4
3	1,2
4	3,6
5	10,7
6	32,1

Os avaliadores foram instruídos a preencher uma ficha, indicando a partir de qual amostra começaram a sentir alguma alteração sensorial na bebida, enfatizando mudanças no sabor adocicado.

A concentração correspondente ao limiar de percepção global foi determinada a partir da média geométrica dos limiares de percepção individuais de cada avaliador. Aos avaliadores que não perceberam estímulo sensorial em nenhuma das amostras, adotou-se como limiar de percepção a concentração seguinte, mantendo-se a progressão geométrica (96 g L^{-1})^[47].

3.5.2. Teste Triangular

Foram realizados dois testes triangulares. No primeiro, foram preparadas duas soluções: Solução A (sem adição de glicerol) e Solução B (glicerol $21,6 \text{ g L}^{-1}$), no segundo teste, a Solução B (glicerol $35,5 \text{ g L}^{-1}$). Para o preparo das soluções, utilizou-se uma cachaça com concentrações de glicerol e açúcares totais abaixo do limite de detecção. As soluções foram apresentadas em ordem variada – conforme a Tabela 4 – a um grupo de 50 avaliadores, 21 do sexo feminino e 29 do sexo masculino no primeiro teste e 20 do sexo feminino e 30 do sexo masculino no segundo teste; todos com idade entre 20 e 40 anos.

Tabela 4 – Ordem das soluções apresentada aos cinquenta avaliadores no teste triangular.

Avaliador	Soluções	Avaliador	Soluções
1	A, A, B	5	B, A, B
2	A, B, A	6	A, B, B
3	B, A, A	7	A, A, B
4	B, B, A	8	...

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Derivatização e análise cromatográfica do padrão de glicerol

A concentração de cloreto de benzoíla e o tempo de reação foram otimizados visando-se obter reprodutibilidade dos resultados com menor consumo de reagentes e tempo de reação possíveis. A Figura 10 ilustra dois cromatogramas, um típico de um branco (todo procedimento de derivatização e extração em fase sólida realizado utilizando água deionizada em vez de amostra e/ou padrão) e um típico do padrão de glicerol com concentração aproximada de $11,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 10 – Cromatogramas típicos de um branco (esquerda) e de uma solução contendo glicerol com concentração aproximada de $11,2 \text{ mg L}^{-1}$ (direita). $t_r \sim 23,8$ minutos.

Observa-se, pelo cromatograma do padrão apresentado na Figura 10 que o pico referente ao glicerol apresentou boa resolução.

4.2. Análise cromatográfica das amostras de cachaça

A Figura 11 ilustra dois cromatogramas típicos obtidos a partir das análises de amostras de cachaças descansada e envelhecida, respectivamente.

Figura 11 – Cromatogramas típicos obtido de uma amostra de cachaça descansada (esquerda) e de uma amostra de cachaça envelhecida (direita).

Observando-se os cromatogramas, é possível observar que a amostra envelhecida de cachaça apresentou um cromatograma mais complexo com maior número de picos cromatográficos, ausentes na amostra descansada. A presença de mais compostos nas amostras envelhecidas já era esperada, pois a etapa de envelhecimento extrai da madeira diversas substâncias, tais como compostos furânicos, benzóicos e aldeídos cinâmicos^[12], monossacarídeos e polióis^[60], que contém grupos hidroxila passíveis de derivatização com cloreto de benzoíla. A Tabela 5 ilustra alguns destes compostos.

Tabela 5 – Alguns compostos típicos extraídos na etapa de envelhecimento^[12,60,61] passíveis de serem derivatizados com cloreto de benzoíla.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
Ácido Gálico		Eugenol
Ácido Elágico		Sinapaldeído
Miricetina		Arabinose
Glicose		Xilose
Manitol		Escopoletina

4.3. Análise cromatográfica hifenada a espectrometria de massas

De acordo com SONNTAG, 1952, a reatividade de esterificação de alcoóis com cloretos de acila segue a seguinte ordem: alcoóis primários > alcoóis secundários > alcoóis terciários^[42]. Para avaliar a extensão da reação de derivatização do glicerol, que contém dois alcoóis primários e um secundário, foi realizada uma série de experimentos utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas na seção 3.3.4 e um espectrômetro de massas como detector.

A Figura 12 ilustra o cromatograma obtido de uma solução padrão de glicerol com 20,0 mg L⁻¹ de concentração. O espectrômetro de massas foi configurado para operar em modo positivo (o modo negativo mostrou-se inadequado para a ionização dos analitos de interesse).

Figura 12 – Cromatograma de íon total (TIC – Total Ion Chromatogram) obtido de um padrão de glicerol com 20 mg L⁻¹ de concentração. No detalhe o espectro de massas obtido para o pico eluído entre 22,8 e 24,0 minutos.

No detalhe da Figura 12 é apresentado o espectro de massas referente ao pico do glicerol; no espectro, o íon molecular 427,1 m/z corresponde ao glicerol benzoilado formando aduto com um íon sódio. Os íons 283,1 m/z e 105,0 m/z correspondem a fragmentos da molécula de glicerol benzoilado. A Figura 13 ilustra a molécula de glicerol derivatizada e o perfil de fragmentação observado no espectro de massas da Figura 12.

Figura 13 – Perfil de fragmentação do glicerol derivatizado. O íon de 427,1 m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ corresponde a uma molécula de glicerol derivatizado com cloreto de benzoíla ($404,2 \text{ g mol}^{-1}$) formando aduto com um íon sódio. Os íons 283,1 m/z $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2]^+$ e 105,0 m/z $[\text{M} - \text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5]^+$ correspondem a fragmentos do glicerol derivatizado.

A partir do cromatograma de íon total (TIC) obtido, buscaram-se por outras possíveis formas de glicerol a partir de cromatogramas de íons extraídos (EIC – *extracted ion chromatogram*), porém não se obtiveram indícios da presença dos seguintes íons 300,1 m/z, referente à benzoilação de duas hidroxilas, 323,1 m/z, referente à benzoilação de duas hidroxilas formando aduto com sódio, 195,1 m/z,

Resultados e Discussão

referente à benzoilação de uma hidroxila e 218,0 m/z, referente à benzoilação uma hidroxila formando aduto com sódio. Isso é um forte indício de que a reação entre o glicerol e o cloreto de benzoíla foi quantitativa, tendo havido a esterificação das três hidroxilas da molécula originando uma única forma do composto benzoilado.

Realizou-se um experimento em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring – Monitoramento de Múltiplas Reações) no qual os íons 427,1 m/z e 283,1 m/z foram selecionados a fim de se verificar os fragmentos originados. A Figura 14 ilustra o cromatograma e os espectros de massas obtidos para um padrão de glicerol com concentração de 20,0 mg L⁻¹.

Figura 14 – (a) Cromatograma obtido de um padrão de glicerol com 20,0 mg L⁻¹ de concentração. (b) Espectro de massas obtido para a fragmentação do íon 427,1 m/z e (c) espectro de massas obtido para a fragmentação do íon 283,1 m/z. Configuração do MS: modo MRM e modo positivo.

O experimento realizado em modo MRM sugere que os fragmentos presentes no espectro de massas extraído da banda referente ao glicerol (Figura 12), são todos relacionados com glicerol derivatizado, porém como os íons 427,1 m/z e 283,1 m/z foram monitorados simultaneamente, não é possível afirmar que o íon 427,1 m/z é precursor do íon 283,1 m/z e que este fragmento dá origem ao íon 105,0 m/z.

Para confirmar a hipótese de que os íons presentes no espectro de massas da Figura 12 têm origem comum, realizou-se um experimento em modo MS/MS monitorando a transição 427,1 m/z $\rightarrow$ 283,1 m/z cujo espectro de massas foi avaliado. A Figura 15 apresenta o cromatograma de íon extraído (283,0 m/z) e o espectro de massas obtido para um padrão de glicerol com concentração de 20,0 mg L⁻¹.

Figura 15 – (a) Cromatograma de íon extraído (283,1 m/z) obtido de um padrão de glicerol com 20,0 mg L⁻¹ de concentração. (b) Espectro de massas MS/MS/MS (427,1 m/z $\rightarrow$ 283,1 m/z $\rightarrow$).

O cromatograma obtido com o espectrômetro de massas em modo MS/MS monitorando a transição $427,1 \text{ m/z} \rightarrow 283,1 \text{ m/z}$ apresentou excelente seletividade e sensibilidade para o glicerol, pois praticamente não apresentou ruído na linha de base. O isolamento e fragmentação do íon $427,1 \text{ m/z}$, com posterior isolamento e fragmentação do íon $283,1 \text{ m/z}$ deixou claro que os três íons mais importantes apresentados no espectro de massas da Figura 12 são todos originados a partir do glicerol derivatizado.

Considerando-se a seletividade e sensibilidade do espectrômetro de massas, preparou-se uma amostra para a confirmação da presença de glicerol em cachaça. A Figura 16 apresenta o cromatograma de íon extraído ($283,1 \text{ m/z}$) obtido para uma amostra de cachaça submetida ao processo de derivatização.

Figura 16 – Cromatograma de íon extraído ($283,1 \text{ m/z}$) obtido de uma amostra de cachaça. MS/MS monitorando a transição $427,1 \text{ m/z} \rightarrow 283 \text{ m/z}$.

Pelos resultados obtidos no experimento apresentado na Figura 16, fica evidente a presença de glicerol em cachaça.

4.4. Recuperação

A metodologia de extração utilizada nesse trabalho foi, inicialmente, baseada nos procedimentos descritos por MIYAGI *et al.*, 2007^[54], porém diversas adaptações tiveram de ser feitas.

Quando se utilizou acetonitrila para eluição das amostras do cartucho de SPE, a recuperação obtida foi abaixo de 50 %. Essa baixa recuperação pode ser atribuída à elevada retenção dos analitos na fase estacionária C18 do cartucho. No procedimento descrito por MIYAGI *et al.*, 2007, os cartuchos de SPE utilizados eram de fase estacionária C8, por esse motivo, para a eluição dos analitos optou-se por utilizar diclorometano, um solvente com menor índice de polaridade ($P'_{\text{acetonitrila}} = 5,8$ e $P'_{\text{diclorometano}} = 3,1$) e, conseqüentemente, maior força eluotrópica^[54,55] que a acetonitrila.

As análises das soluções modelo etanol/água (4:6 v/v) fortificadas com aproximadamente 6,72 mg L⁻¹ de glicerol, realizadas em quintuplicata, apresentaram uma recuperação média igual a $(97,5 \pm 3,2) \%$.

4.5. Avaliação do método proposto

A linearidade do método, avaliada a partir de uma curva analítica (concentração de glicerol versus área do pico), apresentou um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,998 e a seguinte equação de regressão linear: $y = 45885,23 + 60784,10x$.

Os limites de detecção (L.D.) e quantificação (L.Q.) determinados no presente trabalho estão expostos na Tabela 6. Também, com a finalidade de comparação, estão presentes dados da literatura provenientes de diferentes métodos.

Tabela 6 – Limites de detecção e quantificação obtidos no presente trabalho em comparação com alguns dados da literatura.

Método	Matriz do estudo	Nº amostras	L.D. (mg L ⁻¹)	L.Q. (mg L ⁻¹)
A ¹	Cachaça	49	0,25	0,74
B ²	Bebidas destiladas	13	10	-
C ³	Vinhos	23	100	100
D ⁴	Bebidas Fermentadas	9	0,46	-
E ⁵	Biodiesel	-	2,3	-

1 – Análise por HPLC-DAD (presente trabalho), 2 – Análise potenciométrica^[30], 3 – Análise por HPLC-RI (índice de refração)^[29], 4 – Análise por FIA (flow injection analysis – análise por injeção em fluxo) com detecção amperométrica^[31], 5 – Análise por voltametria cíclica^[64].

Em comparação com dados presentes na literatura descritos na Tabela 6, o método proposto no presente trabalho apresenta maior sensibilidade para a análise de glicerol.

A exatidão e precisão do método, calculadas a partir das equações 2, 3 e 4, todas descritas na seção 3.3.8, foram de 97,5 % e 93,5 %, respectivamente.

4.6. Determinação de açúcares totais

A quantificação dos açúcares redutores, realizada em duplicata, foi feita por comparação com uma curva analítica (concentração de glicose versus absorbância em 540 nm), que apresentou um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,999 e um

desvio de 0,00625 para a seguinte equação de regressão linear:

$$y = 0,03576 + 90,03072x.$$

Os limites de detecção e quantificação, estimados a partir das equações 5 e 6 – descritas na seção 3.4.4, foram respectivamente iguais a $2,08 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $6,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, correspondentes a $37,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $125,0 \text{ mg L}^{-1}$; expressos em glicose.

As soluções padrão de sacarose (Soluções A, B, C e D), apresentaram concentrações médias de glicose (em mol L^{-1}) iguais a $12,7 \times 10^{-4}$, $27,9 \times 10^{-4}$, $40,6 \times 10^{-4}$ e $56,4 \times 10^{-4}$, indicando que a hidrólise ácida mostrou-se adequada, pois a estequiometria da reação de hidrólise da sacarose (equação 5) foi obedecida.

As Soluções A', B', C' e D', empregadas para se avaliar a influência do etanol na reação com DNS, apresentaram concentrações médias de glicose (em mol L^{-1}) iguais a $67,3 \times 10^{-4}$, $65,6 \times 10^{-4}$, $30,6 \times 10^{-4}$ e $30,0 \times 10^{-4}$. Em comparação com a Solução A', a Solução B' apresentou uma concentração de glicose aproximadamente 2,5 % menor, enquanto que a Solução D' apresentou uma concentração de glicose aproximadamente 2,0 % menor que a Solução C'. Portanto a presença do etanol não interferiu significativamente na quantificação de açúcares totais.

4.7. Análise quantitativa de glicerol e de açúcares totais

As análises quantitativas de glicerol nas amostras de cachaça foram realizadas em duplicata; o método empregado na quantificação de glicerol foi o de adição de padrão. Este método^[48] é geralmente recomendado para compensar possíveis interferentes presentes nas amostras e/ou quando a matriz pode interferir nas etapas de pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse.

A Tabela 7 ilustra os valores de concentração de glicerol apresentados para as amostras originais corrigidos em função das diversas etapas empregadas na derivatização das amostras. Também estão presentes as concentrações de açúcares totais, expressos em glicose, a nota atribuída ao sabor doce na análise sensorial^[11] e o teor alcoólico das amostras (determinado por densitometria).

Tabela 7 – Concentração de glicerol (em mg L^{-1}), açúcares totais expressos em glicose (mg L^{-1}), nota da análise sensorial atribuída ao sabor doce (de 1 a 9) e teor alcoólico (%) das amostras de cachaça. A ordem das amostras apresentada não é a mesma apresentada na seção 3.1.

Amostra	Envelhecida	Glicerol	Glicose	Doce	Etanol (%)
1	Sim	$7,9 \pm 1,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	3,0	38,6
2	Sim	$14 \pm 5,8 \times 10^{-1}$	<L.Q.	5,0	40,9
3	Não	$0,98 \pm 3,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	3,0	42,6
4	Sim	$33 \pm 3,7 \times 10^{-1}$	$131 \pm 21,9$	4,0	38,2
5	Não	$2,5 \pm 3,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	1,0	40,6
6	Sim	$53 \pm 8,5 \times 10^{-1}$	<L.Q.	5,0	38,2
7	Sim	$1,5 \pm 6,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	3,0	39,4
8	Não	$2,8 \pm 3,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	4,0	41,3
9	Sim	$37 \pm 2,3$	$140 \pm 12,3$	4,0	39,2
10	Sim	$0,79 \pm 1,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	4,0	41,4
11	Sim	<L.Q.	<L.Q.	3,0	38,7
12	Sim	$24 \pm 1,1$	$152 \pm 5,1$	5,0	39,1
13	Não	$0,77 \pm 5,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	3,0	41,7
14	Sim	$38 \pm 4,5 \times 10^{-1}$	$152 \pm 2,1$	4,0	42,5
15	Não	$2,1 \pm 5,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	-	41,3
16	Sim	$22 \pm 7,0 \times 10^{-1}$	$227 \pm 22,0$	3,0	39,2
17	Não	$1,8 \pm 7,0 \times 10^{-2}$	<L.D.	4,0	41,9
18	Sim	$13 \pm 3,7 \times 10^{-1}$	$135 \pm 6,5$	4,0	41,1
19	Sim	$34 \pm 9,2 \times 10^{-1}$	$304 \pm 7,0$	5,0	43,4

Tabela 7 – Continuação.

Amostra	Envelhecida	Glicerol	Glicose	Doce	Etanol (%)
20	Sim	$2,7 \pm 1,2 \times 10^{-1}$	<L.Q.	6,0	40,6
21	Não	<L.D.	<L.D.	4,0	35,4
22	Sim	$20 \pm 5,7 \times 10^{-1}$	$184 \pm 6,1$	4,0	37,4
23	Sim	$66 \pm 1,3$	$421 \pm 7,1$	4,0	42,7
24	Sim	$12 \pm 5,3 \times 10^{-1}$	<L.Q.	3,0	43,9
25	Não	$2,8 \pm 8,0 \times 10^{-2}$	<L.D.	4,0	41,3
26	Sim	$12 \pm 1,3 \times 10^{-1}$	<L.Q.	3,5	45,3
27	Não	<L.D.	<L.D.	4,0	39,0
28	Sim	$4,8 \pm 7,6 \times 10^{-1}$	$358 \pm 7,0$	4,5	38,8
29	Não	<L.Q.	<L.Q.	3,0	40,3
30	Sim	$10 \pm 9,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	5,0	37,7
31	Não	$5,3 \pm 1,9 \times 10^{-1}$	<L.Q.	3,0	38,7
32	Sim	$13,5 \pm 3,2 \times 10^{-1}$	<L.Q.	4,0	40,3
33	Sim	$2,3 \pm 2,0 \times 10^{-2}$	<L.D.	4,0	41,0
34	Sim	$4,3 \pm 1,9 \times 10^{-1}$	<L.Q.	5,0	40,5
35	Sim	$1,3 \pm 5,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	4,0	39,6
36	Sim	$11 \pm 6,1 \times 10^{-1}$	$243 \pm 5,1$	4,0	42,9
37	Sim	<L.Q.	<L.Q.	4,0	41,4
38	Não	<L.D.	<L.D.	5,0	40,4
39	Sim	$27 \pm 1,0$	<L.Q.	6,0	40,5
40	Sim	$25 \pm 6,8 \times 10^{-1}$	$252 \pm 1,9$	4,0	43,8
41	Não	$4,2 \pm 2,3 \times 10^{-1}$	<L.Q.	4,0	41,0
42	Sim	$25 \pm 6,3 \times 10^{-1}$	<L.Q.	5,0	36,8
43	Sim	$31 \pm 1,2$	$138 \pm 6,2$	4,0	37,8
44	Sim	$7,3 \pm 3,0 \times 10^{-2}$	$126 \pm 1,9$	3,0	42,2
46	Não	<L.D.	<L.D.	4,0	38,7
47	Não	$3,4 \pm 5,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	5,0	44,2
48	Sim	$4,3 \pm 2,5 \times 10^{-1}$	<L.Q.	5,0	41,0
49	Não	$2,6 \pm 1,2 \times 10^{-2}$	<L.Q.	5,0	40,0
50	Não	$1,0 \pm 4,0 \times 10^{-2}$	<L.Q.	4,0	43,7
51	Sim	<L.D.	<L.D.	-	-
52	Não	$2,6 \pm 1,7 \times 10^{-2}$	<L.Q.	-	-

As notas atribuídas ao sabor doce se mantiveram entre 3 e 6, com exceção de uma única amostra que recebeu nota 1,0. Onze amostras receberam nota 5 e duas amostras receberam nota 6, destas, dez amostras eram envelhecidas e apenas três descansadas (as três descansadas receberam nota 5). Das treze amostras que obtiveram as maiores notas no sabor doce, apenas duas delas apresentaram concentrações de açúcares totais acima do limite de quantificação (152 e 304 mg L⁻¹ em termos de glicose, equivalentes à 144 e 289 mg L⁻¹ em termos de sacarose). No entanto tais concentrações estão muito abaixo do limiar de percepção do sabor doce (para soluções aquosas: 5 g L⁻¹ para sacarose, 8,75 g L⁻¹ para glicose e 3,75 g L⁻¹ para frutose)^[13,65], o que sugere que os açúcares presentes no conjunto de amostras em questão não devem influenciar no sabor adocicado das bebidas.

O grau o alcoólico de todo conjunto de amostras, determinado por densitometria utilizando-se um picnômetro, variou entre 35,4 e 45,3 %, com média de 40,5 %. Para as amostras que obtiveram as maiores notas para o sabor doce (5 e 6), o grau alcoólico variou entre 36,8 e 44,2 %, com valor médio de 40,3 %. Esses valores, semelhantes aos apresentados pelo conjunto completo de amostras, sugere que o grau alcoólico, no intervalo observado, não deve influir significativamente no sabor adocicado das bebidas estudadas.

Os teores de glicerol das treze amostras que obtiveram as melhores notas para o sabor doce (5 e 6) foi bastante variado, indo desde concentrações abaixo do limite de detecção (amostra 38) até 53 mg L⁻¹ (amostra 6); a concentração média de glicerol para essas treze amostras foi de 15,4 mg L⁻¹. A Tabela 8 apresenta os valores de média, mediana, menor concentração e maior concentração de glicerol para todo o conjunto de amostras, para as descansadas e para as envelhecidas.

Tabela 8 – Comparação entre os valores de média, mediana, menor concentração e maior concentração de glicerol encontrados para as amostras de cachaça (em mg L⁻¹).

Amostras	Média	Mediana	Menor concentração	Maior concentração
Todo conjunto	12,1	2,67	<L.D.	66
Descansadas	1,72	1,42	<L.D.	5,29
Envelhecidas	17,0	12,6	<L.Q.	66

As concentrações de glicerol obtidas para as treze amostras cujas notas do sabor doce foram 5 e 6 não difeririam muito das concentrações de todo o conjunto de amostras, exibidas na Tabela 8. Isso sugere que os teores de glicerol apresentados para o conjunto de amostras, assim como os teores de açúcares totais e grau alcoólico, não têm influência no sabor doce das cachaças. É possível que o sabor doce das cachaças seja oriundo de um efeito sinérgico entre os açúcares, glicerol, etanol e outros compostos presentes na bebida^[65].

Quando as concentrações de glicerol quantificadas para as amostras descansadas e envelhecidas foram comparadas, observou-se que as envelhecidas apresentaram teores significativamente mais elevados de glicerol (Tabela 8). Isso sugere que a etapa de envelhecimento contribui para o aumento das concentrações de glicerol presentes na bebida. O mesmo comportamento foi observado para os teores de açúcares totais, das amostras exibidas na Tabela 10; apenas 14 apresentaram teores de açúcares totais acima do limite de detecção, todas elas envelhecidas.

Para verificar se o envelhecimento contribui significativamente para o aumento das concentrações de glicerol e açúcares totais nas cachaças, foram

estudados quinze extratos de madeiras diferentes (cinco amostras de carvalho, duas amostras de amburana, duas amostras de jatobá, duas amostras de jequitibá branco, duas amostras de canela sassafrás e duas amostras de amendoim).

Todos os extratos de madeira apresentaram, em geral, perfis cromatográficos mais complexos que as amostras de cachaça. Em um dos extratos de jatobá houve coluição de algum composto com tempo de retenção bastante próximo ao do glicerol, não tendo sido possível a quantificação do glicerol nessa amostra.

A Tabela 9 apresenta os valores de glicerol e açúcares totais quantificados nos diversos extratos de madeira.

Tabela 9 – Concentração de glicerol e açúcares totais presentes nos extratos de madeira e na cachaça empregada no preparo destes.

Madeira	Glicerol (mg L ⁻¹)	Glicose (mg L ⁻¹)
Cachaça (Branco)	<L.D.	<L.D.
Carvalho A	15,5 ± 0,46	317 ± 7,9
Carvalho B	4,17 ± 0,40	352 ± 8,8
Carvalho C	*	185 ± 6,7
Carvalho D	*	186 ± 7,5
Carvalho E	*	153 ± 6,6
Amburana A	42,20 ± 0,11	336 ± 8,2
Amburana B	2,31 ± 3,8 x 10 ⁻²	<L.Q.
Jatobá A	12,2 ± 0,33	<L.Q.
Jatobá B	-	<L.Q.
Jequitibá Branco A	3,78 ± 6,0 x 10 ⁻²	<L.Q.
Jequitibá Branco B	7,69 ± 9,7 x 10 ⁻²	<L.Q.

Tabela 9 – Continuação.

Madeira	Glicerol (mg L ⁻¹)	Glicose (mg L ⁻¹)
Canela Sassafrás A	*	<L.Q.
Canela Sassafrás B	*	<L.Q.
Amendoim A	*	<L.Q.
Amendoim B	*	<L.Q.

As amostras marcadas com “*” não foram quantificadas.

Houve algumas discrepâncias nos teores de glicerol de amostras do mesmo tipo de madeira, como o caso das amostras de amburana onde a diferença entre as concentrações de glicerol foi de quase 20 vezes. Para essas mesmas amostras houve variações também nos teores de açúcares totais, porém muitas variáveis estão envolvidas no que diz respeito às madeiras, como a idade da planta, a região de origem, a parte da mesma utilizada no preparo dos extratos, dentre outro fatores que podem explicar tais variações.

Os resultados dos experimentos com os extratos de madeira corroboram com os resultados obtidos na quantificação de glicerol e açúcares totais das amostras: a etapa de envelhecimento contribui significativamente para o aumento da concentração de glicerol nas cachaças.

Em termos das concentrações de açúcares totais, também foi observado aumento durante a etapa de envelhecimento. O aumento desses teores de açúcares é relatado na literatura^[60,61,62,63] em decorrência da quebra das macromoléculas da madeira (lignina, celulose, hemicelulose). Para uísques envelhecidos por 40 anos, foram relatados aumentos de até 2 g L⁻¹ na concentração de açúcares^[61]. Além de glicose e frutose, foram identificados outros açúcares como arabinose, xilose e

ramnose em amostras uísque envelhecidos em carvalho pelo período de seis meses^[61].

Além das amostras apresentadas na Tabela 7, foram quantificados os açúcares totais presentes em outras 20 amostras comerciais populares de cachaça, das quais 8 mencionaram a adição de açúcar no rótulo da bebida. A Tabela 10 exibe as concentrações de açúcares totais para esse novo conjunto de amostras, a partir desses teores, estimou-se a concentração de sacarose que foi adicionada às amostras.

Tabela 10 – Concentração de açúcares totais e a conversão do valor médio para sacarose das 20 amostras comerciais de cachaça.

Amostra	Envelhecida	Adição de açúcar	Glicose (g L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)
A	Não	Sim	16,7 ± 0,32	15,9
B	Não	Sim	21,6 ± 0,40	20,5
C	Não	-	2,63 ± 0,07	2,49
D	Não	Sim	22,7 ± 0,39	21,6
E	Não	-	20,0 ± 0,27	19,0
F	Não	Sim	19,0 ± 0,08	18,0
G	Não	Sim	18,9 ± 0,30	17,9
H	Sim	Sim	17,4 ± 0,28	16,5
I	Não	Sim	16,6 ± 0,22	15,7
J	Não	Sim	17,0 ± 0,26	16,1
K	Não	-	<L.Q.	-
L	Não	-	<L.Q.	-
M	Sim	-	<L.Q.	-
N	Não	-	0,50 ± 0,04	0,47
O	Sim	-	<L.Q.	-
P	Não	-	<L.Q.	-

Tabela 10 – Continuação.

Amostra	Envelhecida	Adição de açúcar	Glicose (g L ⁻¹)	Sacarose (g L ⁻¹)
Q	Não	-	<L.Q.	-
R	Não	-	<L.Q.	-
S	Não	-	<L.Q.	-
T	Sim	-	<L.Q.	-

Do novo conjunto de amostras, apenas a amostra E apresentou teor de açúcar acima do valor permitido pela legislação (6 g L⁻¹) sem que houvesse menção dessa informação no rótulo da bebida. Todas as bebidas ditas adoçadas apresentaram concentrações dentro do limite permitido (até 30 g L⁻¹). As amostras C e N apresentaram concentrações médias de açúcares totais iguais a 2,63 e 0,47 g L⁻¹, respectivamente. Tais teores sugerem que ambas as amostras tenham sido adoçadas, pois não passaram por um processo envelhecimento.

Apesar das observações feitas a partir dos resultados apresentados na Tabela 7, não se notou uma relação clara entre os teores de glicerol e o sabor doce da cachaça. Foram então realizados alguns experimentos de análise sensorial a fim de se tentar compreender melhor o papel do glicerol na bebida.

4.8. Análise Sensorial

4.8.1. Teste de Limiar de Percepção

A Tabela 11 apresenta os limiares de percepção individuais para o glicerol dos 38 avaliadores que avaliaram seis amostras preparadas com a mesma cachaça

empregada nos extratos de madeiras com concentrações crescentes de glicerol (0,0; 0,4; 1,2; 3,6; 10,7 e 32,1 g L⁻¹).

Tabela 11 – Limiares de percepção para o glicerol dos 38 avaliadores, em g L⁻¹.

Avaliador	Limiar de percepção	Avaliador	Limiar de percepção
1	96*	20	0,4
2	32,1	21	1,2
3	10,7	22	96*
4	3,6	23	32,1
5	0,4	24	96*
6	0,4	25	96*
7	0,4	26	10,7
8	0,4	27	32,1
9	96*	28	0,4
10	10,7	29	0,4
11	0,4	30	3,6
12	10,7	31	0,4
13	10,7	32	32,1
14	96*	33	0,4
15	32,1	34	96*
16	96*	35	96*
17	10,7	36	0,4
18	96*	37	96*
19	1,2	38	3,6

Os onze avaliadores cujos limiares de percepção estão representados por “96*” não foram capazes de detectar alteração sensorial alguma em nenhuma das seis amostras apresentadas. Considerou-se como 96 g L⁻¹ o limiar de percepção para esses avaliadores, a próxima concentração seguindo a progressão geométrica

da série de amostras oferecidas. O limiar de percepção global de glicerol (média geométrica dos limiares de percepção individuais) estimado foi igual a 7,37 g L⁻¹.

A literatura^[26] apresenta o limiar de percepção de glicerol para diversas bebidas: em água o limiar é de 4,4 g L⁻¹, para vinho branco é de 9,0 g L⁻¹ e para vinho tinto é de 13,0 g L⁻¹. Acredita-se que o limiar de percepção apresentado pela cachaça deva ser mais elevado que os limiares determinados para a água e o vinho, em decorrência do maior teor alcoólico da bebida destilada, pois o etanol é responsável pela sensação de calor (ou queimação) que diminui a sensibilidade a sabores^[13].

Para verificar se é possível distinguir uma cachaça comum de uma cachaça com elevado teor de glicerol, realizou-se um teste triangular.

4.8.2. Teste Triangular

O primeiro teste triangular foi conduzido com duas soluções, a Solução A, cachaça sem adição de glicerol e a Solução B, cachaça com 21,6 g de glicerol por litro, concentração aproximadamente 3 vezes maior que o limiar de percepção encontrado estimado para o glicerol (~7,4 g L⁻¹).

Apenas 16 dos 50 avaliadores foram capazes de identificar a amostra diferente das três que lhes foram oferecidas.

O segundo teste triangular, conduzido com duas Soluções (Solução A - cachaça sem adição de glicerol e Solução B cachaça com glicerol numa concentração de 35,5 g L⁻¹) apresentou resultado semelhante ao primeiro: apenas

17 dos 50 avaliadores foram capazes de identificar a amostra diferente das três que lhes foram oferecidas.

Não houve, portanto, diferença significativa entre as amostras (em ambos os testes) para um nível de confiança de 0,05. Para que houvesse diferença significativa entre as amostras, pelo menos 24 avaliadores deveriam ter identificado a amostra diferente.

De acordo com os resultados obtidos no teste triangular, o limiar de percepção para o glicerol deve ser mais elevado que o valor estimado em $7,37 \text{ g L}^{-1}$, pois os avaliadores não foram capazes de distinguir, no teste triangular uma amostra de cachaça com uma concentração de glicerol aproximadamente 6,5 vezes maior que limiar de percepção estimado.

5. CONCLUSÃO

A metodologia analítica adaptada para análise de glicerol demonstrou-se apropriada para a determinação deste composto em aguardentes de cana. O método apresentou boa sensibilidade, com baixos limites de detecção ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) e quantificação ($0,74 \text{ mg L}^{-1}$); exatidão de 97,5 % e precisão de 93,5 %.

O método do ácido dinitrossalicílico (DNS), um método clássico, demonstrou-se adequado para determinação de açúcares totais em aguardentes de cana, dispensando a desalcoholização das amostras.

A análise quantitativa mostrou que o envelhecimento tem um papel ativo nas concentrações de glicerol e açúcares totais nas aguardentes de cana. Os estudos com os extratos de madeira de diversas espécies confirmaram essa observação feita para as amostras de aguardente, porém são necessários estudos mais específicos para compreender a contribuição dos metabólitos contidos nas madeiras para os teores de glicerol e açúcares totais.

Observou-se dentro do universo de amostras estudado que as concentrações de glicerol e açúcares totais, bem como o grau alcoólico das mesmas, presentes em cachaças não adoçadas não apresentam relação direta com a nota do sabor doce dessas bebidas.

As concentrações de glicerol encontradas nas aguardentes de cana são de tal monta a não influenciar no sabor doce dessas bebidas. De acordo com o teste triangular, concluiu-se que o limiar de percepção para o glicerol em cachaça foi superior à concentração de $7,37 \text{ g L}^{-1}$ determinada, pois não houve diferença significativa entre uma cachaça sem glicerol e outra com concentração de $35,5 \text{ g L}^{-1}$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. Aguardente. In: VENTURINI, W.G.F. (Ed.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. v. 1, p. 485-524.
2. LEA, G.H.A.; PIGGOTT, J.R. **Fermented beverage production**. New York: Kluwer Academic, 2003. cap 15, p. 335-363.
3. PORTAL São Francisco: **História da aguardente**. Disponível em: <<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/historia-da-cachaca/historia-da-cachaca-1.php>>. Acesso em: 18 abr. 2010.
4. SILVA, J.M. **Cachaça** : o mais brasileiro dos prazeres. São Paulo: Editora Anhembi Morumbi, 2006. p. 27-31.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 13, de 29 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2005. Seção 1, n. 124, p. 3-5.
6. ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Copper (II) catalysis cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2819-2825, 2001.
7. INSTITUTO BRASILEIRO DE CACHAÇA: **Mercado**. Disponível em: <<http://www.ibraccachacas.org>>. Acesso em: 26 abr. 2010
8. AQUINO, F. W. B.; BOSCOLO, L. M.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaca), rum, and whisky. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 784-793, 2008.
9. PITONDO, P. B. A cachaca e o desafio e o desafio da “tequila” brasileira. **Engarrafador moderno**, n. 167, p. 12-17, 2008.

10. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: **Estados produtores de aguardente**. Disponível em: <
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 28 jan. 2010.

11. ODELLO, L.; BRACESCHI, G.P.; SEIXAS, F.R.F.; SILVA, A.A.; GALINARO, C.A.; FRANCO, D.W. Avaliação Sensorial da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1839-1844, 2009.

12. SILVA, A.A.; NASCIMENTO, E.S.P.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3681-3691, 2009.

13. MAIA, A.B.R.A.; CAMPELO, E.A.P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SINDBEBIDAS, 2006. cap. 8, p. 59-64.

14. BOSCOLO, M.; ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Spectrophotometric determination of caramel content in spirits aged in oak casks. **Journal of association of official analytical chemists**, v. 85, n. 3, p. 744-750, 2002.

15. MONICK, J.A. **Alcohols their chemistry, properties and manufacture**. New York: Reinhold Book Corporation, 1968, 195 p.

16. LIMA, U.A. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975, 218 p.

17. NASCIMENTO, R.F.; CARDOSO, D.R.; KEUKELEIRE, D.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Quantitative HPLC analysis of acids in Brazilian cachaças and various spirits using Fluorescence Detection of their 9-Anthylmethyl Esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6070-6073, 2000.

18. NASCIMENTO, R.F.; CARDOSO, D.R.; LIMA-NETO, B.S.; FRANCO, D.W. Determination of acids in Brazilian sugar cane spirits and other alcoholic beverages by HRGC-SPE. **Chromatographia**, v. 48, p. 751-757, 1998.

19. NASCIMENTO, E.S.P.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5488-5493, 2008.
20. GUTIERREZ, L.E. Produção de Glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros"**, v. 48, p. 55-69, 1991.
21. LI, L.; YE, Y.; PAN, L.; ZHU, Y.; ZHENG, S.; LIN, Y. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, p. 778-783, 2009.
22. BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 10, p. 677-682, 1988.
23. REMIZE, F.; BARNAVON, L.; DEQUIN, S. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 3, p. 301-312, 2001.
24. ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; PRIOR, B.A. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 4135-4144, 1994.
25. LUBBERS, S.; VERRET, C.; VOILLEY, ANDRÉE. The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. **LWT – Food Science and Technology**, v. 34, p. 262-265, 2001.
26. NOBLE, A.C.; BURSICK, G.F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, p. 110-112, 1984.
27. NIEUWOUDT, H.; PRIOR, B.; PRETORIUS, I.; BAUER, F. Glycerol and wine quality: fact and fiction. **Wynboer**, v. 9, p. 96-101, 2002

28. HATZAKIS, E.; ARCHAVLIS, E.; DAIS, PHOTIS. Determination of glycerol in wines using ^{31}P -NMR Spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 615-619, 2007.
29. MORO, E.; MAJOCCHI, R.; BALLABIO, C.; MOLFINO, S.; RESTANI, P. A rapid and simple method for simultaneous determination of glycerol, fructose, and glucose in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 58, p. 279-282, 2007.
30. GERVASIO, A.P.G.; BORGES, E.P.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.F.C. Potentiometric flow injection determination of glycerol in distilled spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 74-77, 2002.
31. PRODROMIDIS, M.I.; STALIKAS, C.D.; TZOUWARA-KARAYANNI, S.M.; KARAYANNIS, M.I. Determination of glycerol in alcoholic beverages using packed bed reactors with immobilized glycerol dehydrogenase and an amperometric FIA system. **Talanta**, v. 43, p. 27-33, 1996.
32. JUDD, R.J.; NELSON, R.; KLEIN, S.; JENSEN, M.D.; MILES, J.M. Measurement of plasma glycerol specific activity by high performance liquid chromatography to determine glycerol flux. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 1106-1110, 1998.
33. LI, H.; DONG, J.; CHEN, W.; WANG, S.; GUO, H.; MAN, Y.; MO, P.; LI, J. Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 2089-2096, 2006.
34. NETO, F.R.A.; NUNES, D.S.E.S. **Cromatografia : princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p. 7-17.
35. LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE): métodos cromatográficos de análise 4**. São Carlos: RiMa, 2004. p. 1-17.
36. HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. New York: W. H. Freeman 2007. cap. 28, p. 644-663.
37. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1987. p. 13-17.

38. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. Philadelphia, 1998. cap. 26, p. 674-700.
39. HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. New York: W. H. Freeman, 2007. cap. 25, p. 556-584.
40. BLAU, K.; HALKET, J. **Handbook of derivatives for chromatography**. Baffins Lane: John Wiley, 1993. cap. 3, p. 31-50.
41. OEHLKE, J.; BRUDEL, M.; BLASIG, I.E. Benzoylation of sugars, polyols and amino acids in biological fluids for high-performance liquid chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 655, p. 105-111, 1994.
42. SONNTAG, N.O.V. The reactions of aliphatic acid chlorides. **Chemical Reviews**, v. 52, p. 237-416, 1952.
43. BENTLEY, W.; LLEWELLYN, G.; McALISTER, A. S_N2 Mechanism for alcoholysis, aminolysis, and hydrolysis of acetyl chloride. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 7927-7932, 1996.
44. HARRIS, D.C. **Quantitative chemical analysis**. New York: W. H. Freeman, 2007. cap. 22, p. 488-494.
45. CROTTI, A.E.M. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287, 2006.
46. MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, p. 556, 2003.
47. LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food – principles and practices**. New York: Springer, 1998. cap 6.
48. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. New York: CRC, 1999. cap. 1, p. 1-5.

49. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12995**: Teste triangular em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993, p. 5.
50. MIYAGI, M.; YOKOYAMA, H.; HIBI, T. Sugar microanalysis by HPCL with benzoilation: Improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficiency ODS column. **Journal of Chromatography B**, v. 854, p. 286-290, 2007.
51. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
52. LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. cap. 2, p. 9-28.
53. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Normalização e qualidade**: orientações sobre validação de métodos analíticos. Fev 2003.
54. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
55. SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.
56. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 24, de 8 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2005. Seção 1, n. 11.
57. MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Harlow: Prentice Hall, 2000. cap. 5, p. 107-150.
58. SADEK, P.C. **The HPLC solvent guide**. New York: John Wiley, 1996. cap. 1, p. 1-31.
59. LOUGH, W.J.; WAINER, I.W. **High performance liquid chromatography**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. cap. 4, p. 79-96.

60. ALAÑÓN, M.E.; RUIZ-MATUTE, A.I.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Optimisation of pressurised liquid extraction for the determination of monosaccharides and polyalcohols in Woods used in wine aging. **Journal of Science of Food and Agriculture**. v. 89, n. 15, p. 2558-2564, 2009.
61. MONTERO, C.M.; DODERO, M.C.R.; SÁNCHEZ, D.A.G.S.; BARROSO, C.G. Sugar contents of brandy de Jerez during its aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1058-1064, 2005.
62. SIMÓN, B.F.; ESTERUELAS, E.; MUÑOZ, A.M.; CADAHÍA, E.; SANZ, M. Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 3217-3227, 2009.
63. MITTAL, A.; SCOTT, G.M.; AMIDON, T.E.; KIEMBLE, D.J.; STIPANOVIC, A.J. Quantitative analysis of sugars in wood hydrolyzates with ^1H NMR during the autohydrolysis of hardwoods. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6398-6406, 2009.
64. LOURENÇO, L.M.; STRADIOTTO, N.R. Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique. **Talanta**. v. 79, p. 92-96, 2009.
65. SCHIFFMAN, S.S.; SATTALY-MILLER, E.A.; GRAHAM, B.G.; BOOTH, B.J.; GIBES, K.M. Synergism among ternary mixtures of fourteen sweeteners. **Chemical Senses**. v. 25, p. 131-140, 2000.