Alexandre Ataíde da Silva

Aplicação de análise multivariada aos dados de análise cromatográfica e espectroscopia para a diferenciação de extratos de madeira.

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr Douglas Wagner Franco

São Carlos
2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eliseu e Leontina, meu irmão Henrique e minha sobrinha Letícia, que estiveram sempre comigo e são os maiores incentivadores e razão desta luta.

A Carina, pelo amor, carinho e companheirismo ao longo deste trabalho.

A minha pequena sobrinha e afilhada Izabel Arlete (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me socorrer nos momentos difíceis e me dar paz para aproveitar os bons momentos.

A Carina, pela sua dedicação, amor, compreensão, amável companhia e ajuda na formatação desta tese.

Aos meus enteados, Pedro e Murilo, meninos maravilhosos e queridos.

A minha cunhada Camila, pela amizade e bons momentos nas reuniões familiares.

Aos amigos do LDQA que me acompanharam nesta jornada: Carlos Cajuru, Eduardo, Wendel, Felipão, André Barbie, Aline, Silmara, Regina, Ana Claudia, Pedro (Peter coio), Silvia, Natalia, Ivonete, Ticiane, Thiago Papa, Barbie, Tiago (Yudi), Leandro Boizão e Line.

Aos amigos do Laboratório de Inorgânica, Antonio Nana, Maycon, Gustavo Barba, Daniela, Aline Tavares e Thiago.

Ao Professor Douglas, pela orientação ao longo destes anos, pelos conselhos pessoais e profissionais e amizade.

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigues pela estimada amizade.

Aos amigos Willian Diamond e família, Flávio baixinho, Pedro (Baiano), Carol, Magão, Petacci, Melchior, Dirlandi, Juba, Edvan, Evania, Zé Luiz e tantos outros que não caberiam numa página só.

As secretárias Veroneide, Cláudia e Gisleine, Silvia (pós) e Andréia (pós) por sempre socorrer nos momentos de aperto e pela amizade.

E a todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma, alguns muitos, outros poucos, mas todos com sua importância e serão sempre lembrados. Aos que não contribuíram agradeço por não ter atrapalhado.

"Se eu conhecesse a causa da minha ignorância, seria um sábio."

(Kahlil Gibran)

Trabalha como se vivesses para sempre. Ama como se fosses morrer hoje.

(Sêneca)

"Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.". *(Confúcio)*

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las" *(Aristóteles)*

RESUMO

A presença de 14 compostos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, vanilina, siringaldeído, sinapaldeído, coniferaldeído, ácido vanílico, sirínico ácido, a quercetina, trans-resveratrol, catequina, epicatequina, eugenol, e miricetina) e duas cumarinas (escopoletina e cumarina) foi investigada por HPLC-ESI-MSⁿ em um total de 25 extratos de aguardente de seis diferentes madeiras brasileiras e o carvalho, comumente utilizados pela indústria de tanoaria para o envelhecimento da cachaça. Estes dados foram comparados com os anteriormente obtidos utilizando HPLC-DAD-Fluorescência. Questões pendentes relativas à atribuição da epicatequina, co-eluições do ácido gálico e do ácido elágico respectivamente foram resolvidas utilizando HPLC-ESI-MSⁿ. Além disso, elaborou-se uma impressão digital cromatográfica de HPLC-DAD usando a análise quimiométrica (PCA) com base nos perfis de eluição cromatográfica dos extratos monitorizada a 280 nm. As principais diferenças observadas entre o carvalho e as madeiras brasileiras reside nas concentrações de cumarina, catequina, siringaldeído, e coniferaldeído. A análise quimiométrica do perfil do quantitativo dos 14 compostos fenólicos e das duas cumarinas nos extratos de madeira permitiu uma boa diferenciação entre os extratos das madeiras brasileiras e os extratos de carvalho. A impressão digital cromatográfica analisada por PCA revelou diferenças significativas entre as madeiras brasileiras e o carvalho, definindo claramente seis grupos de extratos de madeira: (i) extratos de carvalho, extratos (ii) de jatobá, (iii) cabreúva- parda extratos, (iv) os extratos de amendoim (v) canela-sassafrás e extratos (vi) de pequi. As análises multivariadas de UV-Vis de dados espectrais de 93 extratos de cachaça, de madeiras brasileiras e de carvalho, forneceu um modelo simples e robusto para classificar cachaças brasileiras de acordo com as espécies de madeira utilizados nos barris de maturação. Aplicação de PCA (Análise de Componentes Principais) e HCA (análise hierárquica de agrupamentos) levou a identificação de 7 agrupamentos; amburana, amendoim, balsamo, castanheira, jatobá, jequitibá e carvalho. A

aplicação de LDA (Análise Discriminante Linear) aos resultados experimentais permitiu a classificação de 10 diferentes espécies de madeira utilizadas nos extratos de cachaça; amburana, amendoim, balsamo, cabreúva-parda, canela sassafrás, castanheira, jatobá, jequitibá-rosa, louro-canela, e carvalho, com uma precisão variando de 80% (amendoim e Castanheira) a 100% (bálsamo e jequitibá-rosa). A auto consistência do modelo foi verificada usando 50 amostras de cachaças comerciais. Um índice de classificação muito bom foi observado para este modelo, cuja atribuição correta variou de 100% a 80 %. A metodologia aqui desenvolvida (UV-vis) fornece uma alternativa de baixo custo e robusta a cromatografia líquida e a espectrometria de massa para identificar as diferentes espécies de madeira utilizadas nas construções dos barris em que destilados foram armazenados. Além disso, ela contém potencial como uma possível ferramenta forense para a identificação de madeiras objetivando controlar a extração de espécies em risco. Estes desenvolvimentos poderao ser ampliados para outros destilados e para uma maior variedade de espécies de madeira.

ABSTRACT

A total of 25 sugarcane spirit extracts of six different Brazilian woods and oak, commonly used by cooperage industries for aging cachaça, were analyzed for the presence of 14 phenolic compounds (ellagic acid, gallic acid, vanillin, syringaldehyde, synapaldehyde, coniferaldehyde, vanillic acid, syringic acid, quercetin, *trans*-resveratrol, catechin, epicatechin, eugenol, and myricetin) and two coumarins (scopoletin and coumarin) by HPLC-ESI-MSⁿ. This data was compared with the previous one obtained from HPLC-DAD-Fluorescence. Pending questions regarding to epicatechin attribution, galic acid and elagic acid co-elution have been solved through HPLC-ESI-MSⁿ analysis. Furthermore, an HPLC-DAD chromatographic fingerprint was build-up using chemometric analysis based on the chromatographic elution profiles of the extracts monitored at 280 nm. The main difference observed among oak and Brazilian woods remains in the concentration of coumarin, catechin, syringaldehyde, and coniferaldehyde. The chemometric analysis of the quantitative profile of the 14 phenolic compounds and two coumarins in the wood extracts provides a good differentiation between the Brazilian wood and oak extracts. The chromatographic fingerprint treated by multivariate analysis revealed significant differences among Brazilian woods themselves and oak, clearly defining six groups of wood extracts: (i) oak extracts, (ii) jatobá extracts, (iii) cabreúva-parda extracts, (iv) amendoim extracts, (v) canela-sassafrás extracts and (vi) pequi extracts.

Multivariate analyses of UV-Vis spectral data from 93 cachaça wood extracts provide a simple and robust model to classify aged Brazilian cachacas according to the wood species used in the maturation barrels. Application of PCA (Principal Components Analysis) and

HCA (Hierarchical Cluster Analysis) leads to identification of 7 clusters of cachaca's wood extracts (amburana, amendoim, balsamo, castanheira, jatoba, jequitibá and oak). LDA (Linear Discriminant Analysis) affords classification of 10 different wood species used in the cachaça extracts (amburana, amendoim, balsamo, cabreuva-parda, canela-sassafras, castanheira, jatobá, jequitiba-rosa, louro-canela, and oak) with an accuracy ranging from 80% (amendoim and castanheira) to 100% (bálsamo and jequitibá-rosa). This model self consistency was checked using 50 samples of commercial cachaças. A very good classification was observed for this model, which 100 to 80% of correct assignment.

The methodology provides a robust low-cost alternative to methods based on liquid chromatography and mass spectrometry to classify cachaças aged in barrels that are composed of different wood species. Furthermore, it holds some potential as a possible forensic tool for wood identification which could be applied to control the wood marked of endangered species. Our findings could be extended to other spirits and to a wider variety of wood species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte transversal de um tronco de madeira de carvalho, mostrando ao centro o cerne, matéria prima para a indústria tanoeira ¹	3
Figura 2- Safrol (5-(2-propenil)-1,3- benzodioxole).....	4
Figura 3- Cumarina (2 <i>H</i> -chromen-2-one).....	5
Figura 4 – Correlação entre descrições objetivas de análise sensorial da cachaça e índice global de preferencia. ³³	10
Figura 5 – Histograma indicando a média do consumo de oxigênio para cada espécie. Índice abaixo da unidade indica um efeito antioxidante. ⁵²	16
Figura 6 - Estrutura molecular de alguns compostos encontrados em madeiras brasileiras e carvalho.....	18
Figura 7- Exemplo da análise realizada considerando características morfológicas para diferenciar uma amostra de maparajuba (<i>Manilkara bidentata ssp. Surinamensis</i>) e uma amostra de maçarandubinha (<i>Manilkara paraensis</i>) que são facilmente confundidas ⁵⁷	19
Figura 8 - Gráficos de score para PCA (PC1 x PC2) dos extratos etanólicos de madeiras avaliados por HPLC, a partir da análise do <i>fingerprint</i> cromatográfico ($\lambda = 280$ nm).....	32
Figura 9 – Gráfico de loading para os valores da PC1, onde se observa os picos com maiores valores e seus respectivos tempos de retenção.....	33
Figura 10 – Gráfico de scores (PC2 13%x PC3 10%) para os extratos etanólicos obtidos a partir dos cromatogramas ($\lambda = 280$ nm).....	35
Figura 11 – Gráfico de loading para os valores da PC2, onde se observa os picos com maiores valores e seus respectivos tempos de retenção.....	36

Figura 12 – Gráfico de loading para os valores da PC3, onde observa-se os picos com maiores valores e seus respectivos tempo de retenção.....	37
Figura 13 – Fragmentograma do pico relativo a catequina no modo negativo ESI (-) em uma amostra de extrato de amendoim, nota-se os íons característicos da fragmentação da catequina (m/z: 289, 271 e 245).....	39
Figura 14 – Amostra de extrato de carvalho exemplificando a dificuldade de se quantificar o ácido gálico em detector espectrofotométrico ($\lambda = 280$ nm) no gradiente de eluição empregado (vide secção 2).....	41
Figura 15 – Cromatograma do extrato etanólico obtido por gradiente de eluição (vide secção 2) em HPLC-DAD ($\lambda = 280$ nm) de um extrato de castanheira exemplificando a coeluição do pico de ácido elágico com o de um composto desconhecido.....	42
Figura 16 – Cromatograma do íon extraído (íon selecionado 301, modo negativo) obtido a partir do gradiente de eluição (vide secção 2) analisado por HPLC-ESI(-)-MS ⁿ em uma amostra de castanheira.....	43
Figura 17 – Produtos da fragmentação do pseudo-íon molecular $[M-H]^-$ para o pico extraído referente ao ácido elágico operando no modo negativo (ESI(-)).....	44
Figura 18 – Espectro de massas obtido para uma amostra de carvalho via inserção direta.....	47
Figura 19 – Gráfico de scores gerados a partir do fragmentos gerados por ionização por “eletrospray” via inserção direta dos extratos etanólicos de madeiras.....	48
Figura 20 – Gráfico de scores obtido a partir dos valores de absorbância dos espectro eletronicos na região do UV-vis (220-400 nm).....	52
Figura 21 – Gráfico de loading gerado a partir dos valores de absorbância para os espectros eletronicos das amostras de madeiras medidas entre 220-400 nm.....	53
Figura 22 – Exemplos dos espectros eletrônicos característicos de alguns extratos de madeiras analisados.....	55

Figura 23 – Valores da primeira derivada aplicada aos espectros eletrônicos da Figura xx....	55
Figura 24 – Gráfico de <i>scores</i> visualizados na PC1 vs PC2 para os extratos de madeiras obtidos a partir dos espectro eletronicos na faixa de 220-400 nm.....	57
Figura 25 – Gráfico de <i>scores</i> visualizados na PC1 vs PC3 para os extratos de madeiras obtidos a partir dos espectro eletronicos na faixa de 220-400 nm.....	57
Figura 26 – Gráfico de <i>loading</i> (PC1 vs PC2) para os dados espectrais dos extratos de madeiras obtidos no intervalo de 220-400 nm.....	59
Figura 27 - Dendrograma obtido a partir da análise hierarquica de cluster para os extratos de sete tipo de madeiras (carvalho, amendoim, amburana, bálsamo, jatobá, jequetibá e castanheira).....	60

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação do ácido acético com etanol gerando acetato de etila durante o processo de maturação.....	13
Esquema 2 – Reação da acroleína durante o período de maturação (Cornell, 1997).....	13
Esquema 3 – Sequência de reações de para conversão de compostos fenólicos relacionados à lignina durante o processo de estocagem em tonéis de madeira, onde K_i e k_i' ($i= 1,2,3...$) são constantes de velocidade específica para as reações de conversão Nishimura, 1998).....	14
Esquema 4 - _principais etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica (LH- ácido graxo polinsaturado; $OH^\bullet$ ou $LO^\bullet$ - radical alcóxila; $L^\bullet$ -radical lipídico; $LOO^\bullet$ - radical peróxila).....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parametros utilizados no espectrometro de massas.....	29
Tabela 2 - Principais fragmentos para os picos identificados, m/z para os pseudos íons-moleculares nos modos negativos (ESI(-)) e positivos (ESI (+)), $\epsilon_{\max}$ para cada compostos e as espécies de madeiras onde estes compostos foram identificados.....	45
Tabela 3 - Principais íons selecionados para análise multivariada.....	50
Tabela 4 – Resultados obtidos para a classificação dos extratos de madeiras para os modelos de calibração e validação (validação cruzada).....	62
Tabela 5 – Validação-cruzada para classificação de cachaças comerciais envelhecidas em diferentes tipos de madeiras.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	02
2. OBJETIVO.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Reagentes.....	23
3.2 Amostras de madeiras.....	23
3.3 Preparo dos extratos.....	24
3.4 Espectros eletrônicos (UV-vis).....	24
3.5 Condições Cromatográfico.....	25
3.6 Análise dos fragmentogramas via inserção direta.....	25
3.7 Análise multivariada.....	26
3.7.1 Tratamento dos dados espectrais.....	26
3.7.2 Tratamento dos dados cromatográficos.....	28
3.7.3 Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS ⁿ).....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Análise multivariada aplicada aos cromatogramas obtidos HPLC-DAD (280 nm).....	31
4.2 Identificação cromatográfica.....	38
4.3 Fingerprint de Espectrometria de massas por ionização por “eletrospray”.....	46
4.4. Análise multivariada aplicada ao espectro eletrônico na região do UV-vis.....	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
6. REFÊRENCIAS.....	70
ANEXO I.....	79

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A armazenagem de bebidas em tonéis de madeira é extensamente empregado devido as características sensoriais positivas conferidas as bebidas pelo envelhecimento. Embora a qualidade sensorial da bebida possa ser afetada pela a água empregada, pelo processo fermentativo, pelo material de origem, pelo formato do destilador, o material empregado na construção do tonél, e demais fatores que envolvem a cadeia de produção, o envelhecimento é ainda considerado por muitos, como a “lapidação da bebida”.¹

Envolto em muita mística sobre sua origem, o uso de ânforas se remete ao antigo Egito. Entretanto acredita-se que no século XIX, os escocêses ainda consumiam uisque não envelhecido.²

Morfológicamente, o cerne da madeira é o material de partida para a confecção dos tonéis. O cerne, palavra que tem a mesma origem etimológica que *núcleo*, é a designação dada à parte do xilema do tronco que já não mais participa ativamente na condução de água, assumindo assim uma função essencialmente de suporte mecânico da estrutura da planta (Figura 1). A madeira do carvalho (*Quercus sp*) apresenta uma estrutura que beneficia a manufatura de tonéis (raias medulares, teores de tilose, porosidade), características estas detalhadas em varios trabalhos³. Durante o armazenamento para um tonel de carvalho observa-se em média a perda de 10% do volume do destilado por ano. Durante o período de estocagem pode se perder mais água ou álcool, dependendo das condições de armazenamento da bebida (umidade e temperatura do local)³. O volume perdido durante o envelhecimento é conhecido internacionalmente como “the angels' share” (parte dos anjos), o que no Brasil poderia ser entendido como “parte do santo”.⁴

Figura 1- Corte transversal de um tronco de madeira de carvalho, mostrando ao centro o cerne, matéria prima para a indústria tanoeira¹.

Em países onde o carvalho é abundante o uso de tonéis virgens é ainda praticado. Este é o caso dos Estados Unidos da América do Norte, que dispõe de uma grande reserva de carvalho branco (*Quercus alba*). Países como a Escócia, onde este recurso é limitado, e a exploração encontra-se em declínio⁵, a reutilização de tonéis provenientes do envelhecimento de sherry (vinho fortificado de uvas brancas) e de brandy (destilado de uva) tornou-se comum^{1,6}. No Brasil, onde a prática de envelhecimento de bebidas ainda se encontra em processo de implantação, é frequente a reutilização de tonéis de carvalho provenientes do exterior e previamente já utilizados em outros processos de maturação de bebidas, tais como uísque escocês.

O controle sobre a qualidade de aquisição destes tonéis e a sua reutilização no Brasil ainda não foi disciplinado. Uma crescente, porém ainda pouco estudada vertente esta se desenvolvendo de modo empírico no país. Trata-se do emprego de madeiras nativas para a

confeção de tonéis. Este processo em muitos casos faz uso do conhecimento popular, e de tradições passadas de geração para geração.^{7,8}

Dentre as madeiras brasileiras empregadas nas tanoarias nacionais, destacam-se o jatobá (*Hymenaea courbaril*), o amendoim (*Pterogyne sp.*), o jequitibá (*Cariniana sp.*), a cabreúva parda (*Myrocarpus frondosus*), a amburana (*Amburana Cearensis*), a castanheira (*Bertholletia excelsa*), a grábia (*Apuleia Leiocarpa*), o bálsamo (*Myroxylon balsamum*), e a canela- sassafrás (*Ocotea odorifera*) além de outras, de menor expressão no mercado.^{7, 8, 9}

A canela sassafrás apresenta odor agradável, mas vale ressaltar que o seu uso não é aconselhado, devido a presença do composto safrol (5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole) (Figura 2). Este composto teve seu uso banido desde a década de 60 pela Food Drugs Administration (FDA) por ser comprovadamente um agente cancerígeno em ratos¹⁰, e por ser considerado pela Comissão Europeia sobre Saúde e Protecção do Consumidor como genotóxico e cancerígeno.¹¹

Figura 2- Safrol (5-(2-propenil)-1,3- benzodioxole).

Ainda no tocante ao aspecto toxicológico, estudos realizados com extratos de madeiras de jatobá e amendoim¹², indicam a presença de elevados teores de cumarina (Figura 3),

composto também controlado em bebidas e alimentos e cujo teor para bebidas alcoólicas esta limitado em 10 mg Kg^{-1} nas bebidas.¹³

Figura 3- Cumarina (1,2-benzopirano).

Cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico. São amplamente distribuídos nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias.

Devido ao seu odor característico que se assemelha a baunilha^{14,15}, foram amplamente utilizadas como aromatizantes pelas Industrias¹⁶. Porém evidenciada sua possível toxicidade acima de certa concentração passou a ser classificada como uma substância tóxica¹⁷, porém não o suficiente para conduzir ao óbito. Assim passou a ter utilização restrita em produtos de limpeza e cosméticos. São conhecidas suas atividades anticoagulante, vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica. Um exemplo disto é o extrato de castanha da índia, muito utilizada contra varizes.¹⁷

No âmbito legal, no Brasil, a aguardente envelhecida tem sua denominação regulada por meio do decreto n. 6871, seção IV¹⁸ segundo o qual: “ a aguardente e a cachaça são reconhecidas como sendo envelhecidas se contiverem em sua composição, no mínimo, 50% de aguardente de cana envelhecida por período não inferior a um ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor”. Não existe qualquer especificação sobre o tipo de madeira do tonél ou o pré-tratamento, mencionando-se apenas a capacidade máxima do recipiente 700 litros. A madeira mais empregada é o carvalho. Existem ainda as definições das categorias *aguardente Premium* e *Extra Premium*. A primeira refere-se a “bebida que

contém 100% de aguardente de cana ou destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar envelhecidos em recipiente de madeira, com capacidade máxima de 700 (setecentos) litros, por um período não inferior a 1 ano”. A *Aguardente Extra Premium*, é definida como: “bebida que deve ser 100% envelhecida por período não inferior a 3 anos”. No Brasil não estão estipulados os volumes específicos dos tonéis mas apenas seus volumes máximos. No exterior para algumas bebidas estes volumes são controlados como é o caso do uísque americano que faz uso de tonies de 180 litros.¹⁹

Outro fato que merece maior atenção diz respeito a queima dos tonéis, pois este processo influencia sobremaneira as qualidades químicas e sensoriais do produto final. O tratamento térmico, “tostas” ou “queimas”, como são chamados, são práticas tradicionalmente aplicadas para facilitar o manuseio da madeira durante a dobra do tonel²⁰, e também, e mais importante ainda do ponto de vista químico, por criar um revestimento interno de carvão, o que promove a extração de moléculas e íons presente na aguardente, e a dissolução de moléculas oriundas da pirólise ou solvolise das paredes do recipiente pela bebida ali estocada. A lignina, no caso das bebidas sofre etanólise, originando moléculas de fundamental importância sensorial para bebidas destiladas.²¹

A tostagem interna dos tonéis ocorre em diferentes níveis e sua contribuição na contaminação da aguardente com hidrocarbonetos policíclico aromáticos oriundos da pirólise da madeira deve ser melhor investigada. É reconhecido que a queima da cana conduz a contaminação de bebidas com HPAs²². Porém ainda não há estudos que avaliem a influência do tempo e da extensão (intensidade) nível da queima de diferentes madeiras na composição química da aguardente.

Com raras exceções²³, os trabalhos publicados são majoritariamente restritos ao carvalho^{24, 25}. O controle do tempo de envelhecimento, e as informações mínimas sobre a

composição química de madeiras brasileiras, que certamente influenciam nas qualidades do produto final, são questões ainda em aberto.

Um ponto que constantemente é avaliado em cachaças envelhecidas diz respeito ao teor de cobre. Trata-se de um parâmetro constante nas chamadas “análises físico-químicas” de bebidas. Este parâmetro apresenta uma diminuição a medida que ocorre o envelhecimento da cachaça. Isto é atribuído em geral ao fato os tonéis terem sua superfície interna queimada antes do processo de estocagem, o que cria uma camada de material carbonizado adsorvente. Um estudo mais profundo sobre estes fatores e possíveis efeitos memória destes tonéis, sua reutilização em processo de envelhecimento de bebidas é recomendado.

Não há metodologia oficial recomendada que permita atribuir de forma inequívoca o tempo de envelhecimento e o impacto sensorial relativo aos fatores que influenciam o processo de envelhecimento: dimensão e o número reutilizações dos tonéis, tipo de madeira, influência do tempo de exposição a determinado tipo de madeira, a porosidade de cada madeira.

A legislação também não define os quesitos para a prática do chamado “descanso” da bebida. Isto seria o repouso do destilado por períodos que variam de 1 a 6 meses em dornas de madeiras denominadas “neutras” (amendoim, jequitibá, freijó) ou em tonéis de aço inoxidável. Embora estas últimas madeiras possam adicionar a bebida atributos sensoriais menos intensos, a “neutralidade” destas madeiras merece maior atenção.^{12, 13, 26}

No âmbito da análise química, os trabalhos se concentram das características físico-química das aguardentes envelhecidas em tonéis de carvalho, as quais se constituem em padrão comparativo para as demais madeiras. De forma semelhante ao que se observam para outros destilados envelhecidos, os resultados mostram que o envelhecimento da aguardente em tonéis de carvalho altera a sua composição química e as suas propriedades sensoriais²⁷. Não é demais ressaltar que ao passar por este processo, a cachaça apresenta uma melhoria

com respeito aos padrões gerais de qualidade estabelecidos pela legislação nacional em vigor²⁸. Após o período de 1 ano de armazenamento, a aguardente passa a apresentar maiores teores de acidez volátil, ésteres, aldeídos, furfural, álcoois superiores, congêneres, extrato seco e tanino.²⁸

Os “congêneres” correspondem a uma pequena fração de metabólitos secundários (aproximadamente 1% da composição) provenientes do processo fermentativo e da destilação²⁹. Pela legislação¹⁸, congêneres (componentes voláteis “não álcool”) é a soma de acidez volátil, aldeídos, ésteres, álcoois superiores e furfural. Nem todos os compostos provenientes durante o processo de fermentação e destilação são controlados, podendo-se destacar as séries dos ácidos carboxílicos, dos alcoóis superiores, dos ésteres, dos aldeídos, das cetonas, dos compostos nitrogenados e dos sulfurados. Os conjuntos destes compostos, carecidos de outros mais dão origem ao “bouquet” da bebida.³⁰

A literatura informa que^{27,28} o aumento da acidez em uma bebida alcoólica envelhecida em tonéis de carvalho, não se deve somente ao aumento das concentrações de ácidos carboxílicos provenientes da destilação ou de processos oxidativos envolvendo aldeídos e demais compostos do próprio destilado. Também contribuem para o aumento a presença de substratos da madeira dissolvidos na bebida devido a etanólise .

Por exemplo, o extrato do carvalho contém ácidos fenólicos (gálico, tanínico, ferúlico, siríngico e vanílico) em sua composição os quais são incorporados na bebida durante a maturação.

Ainda que o sabor doce das bebidas envelhecidas seja uma das características mais marcantes do envelhecimento suas origens ainda não estão totalmente esclarecida quais os compostos responsáveis por tal qualidade. Compostos como o maltol, o furfuraldeído, o etil hexanoato e o próprio etanol estão entre estes candidatos, mas certamente o aldeído fenólico vanilina, destaca-se entre os compostos mais relevantes para o sabor adocicado das bebidas

envelhecidas. Suas características associadas ao sabor de caramelo, *toffe* e baunilha estão sempre presentes em painéis de análise sensorial e em avaliações com degustações. Os compostos fenólicos também são associados ao sabor “turfado”, relacionado com a degradação da lignina durante o processo de queima dos tonéis²⁹. O fenol, os cresóis (o-, m-, p-), o xilenol, os p- e m- etilfenol, o guaicol e os metoxi-fenois são considerados importantes para o impacto sensorial das bebidas envelhecidas²⁹. Aldeídos cinâmicos e ácidos benzóicos também provenientes da degradação da lignina e das reações ocorrentes nos destilados conferem o atributo “defumado” participando assim de forma relevante do *bouquet* das bebidas envelhecidas.³¹

Ainda não muito explorado no mercado brasileiro de cachaça, mas certamente necessário principalmente em se tratando se de bebidas envelhecidas e o uso da análise sensorial. Esta do ponto de vista comercial é de extrema importância, pois as diferentes madeiras alteram sobremaneira as propriedades organolépticas do produto. Estas qualidades devem ser avaliadas, sem prejuízo de seus impactos com relação a saúde do consumidor, pois diferentes madeiras conduzem a diversos produtos que agradam diferentes paladares. Esta diversificação é saudável e se bem explorada, beneficia nossa bebida nacional.

Os principais métodos utilizados para a avaliação sensorial de destilados e, portanto da cachaça são: o afetivo e o descritivo^{32,33}. O primeiro tem por objetivo avaliar a aceitação e a preferência dos consumidores em relação a um ou mais produtos. O segundo permite a definição e a avaliação dos atributos sensoriais de produtos. Neste caso, são empregadas equipes treinadas de provadores. São considerados indicadores hedônicos positivos a intensidade de cor, o sabor adocicado, e o aroma de baunilha e ou de côco.^{32, 33, 34}

A Análise Descritiva Quantitativa³⁵ de aguardentes de cana envelhecida em tonéis de carvalho, indica que as características sensoriais das amostras mudam significativamente ($p \leq 0,05$) com o aumento do tempo de envelhecimento. O produto após o período de 48 meses

de envelhecimento caracteriza-se pelo aroma típico de madeira, pela doçura inicial e residual, pelo aroma de baunilha, pela coloração amarela e pelo gosto inicial e residual de madeira pronunciado. Por outro lado, o aroma alcoólico, a agressividade e os sabores inicial e residual de álcool, indicadores hedônicos negativos, se apresentam significativamente inferiores aos das amostras mais jovens, ou da mesma idade, mas mantidas em recipiente de vidro. A Figura 4 exemplifica um gráfico de gerador hedônico³³.

Figura 4- Correlação entre descrições objetivas de análise sensorial da cachaça e índice global de preferência.³³

Em estudos recentes³³ utilizando a análise sensorial descritiva foram sugeridos como possíveis descritores para a avaliação sensorial da aguardente os seguintes parâmetros: oleosidade, intensidade de cor amarela, calor, ardor, doce, acidez, maciez/suavidade, amargor, floral, frutado, madeira e álcool. Paralelamente, para o mesmo conjunto de amostras foi aplicado o teste sensorial afetivo. As sensações: visiva, olfativa, gustativa e gustolfativa, foram avaliadas. Os resultados tanto do método descritivo como do método afetivo indicaram que as cachaças melhores classificadas foram as envelhecidas em barris de carvalho por um período não inferior a 24 meses.³³

A aceitação de aguardentes envelhecidas em pequenos tonéis de madeiras (15 L) de carvalho e também das madeiras brasileiras: amarelo, amendoim, balsamo, jatoba, louro, pau d'arco, pau d'oleo, pereiro também foi objeto de estudo³⁶. A análise de variancia indicou diferenças significativas nos resultados dos testes sensoriais para os itens aroma, sabor e cor para cada uma das madeiras. As amostras envelhecidas em carvalho, bálsamo, jatobá e amendoim obtiveram as melhores pontuações de aceitabilidade no item aroma. Uma distribuição similar foi observada para o quesito sabor. As cachaças envelhecidas em carvalho, pereiro e amendoim apresentaram valores médios bastante similares entre si, e superior aos demais. Com respeito a cor, novamente carvalho, amendoim e louro canela, nesta sequência, foram as preferidas seguidas por pereiro e jatobá. Embora a análise sensorial seja reconhecida como ferramenta decisiva na apresentação de um novo produto ao mercado^{37,38}, a legislação brasileira não contempla parâmetros organolépticos.

A avaliação sensorial de aguardentes após diferentes tempos de armazenamento em tonéis de carvalho demonstrou que a sua aceitação cresce a medida que aumenta o tempo de envelhecimento. As maiores alterações ocorrem nos primeiros 24 meses, a partir do que a melhoria passa a ocorrer de forma assintótica³⁹. É pequena a diferença nas propriedades sensoriais entre a mesma bebida após quatro e cinco anos de envelhecimento. As aguardentes envelhecidas são preferidas pelos consumidores, com respeito as aguardentes não envelhecidas, e aos produtos envelhecidos parcialmente adicionados de aguardentes não envelhecidas.

A compreensão do processo de maturação da cachaça, certamente requer o conhecimento da variação da sua composição química. O melhor conhecimento do perfil químico da aguardente envelhecida é importante para melhor descrever, suas propriedades e os seus eventuais efeitos sobre a saúde do consumidor. Para tanto o desenvolvimento de metodologias acessíveis ao pequeno produtor e que possam proporcionar confiabilidade,

qualidade e rastreabilidade dentro da cadeia produtiva deve ser incentivado. A acessibilidade a estas metodologias é fundamental para a sua implementação e consequente melhor controle da qualidade da aguardente.

A composição em compostos fenólicos é muito importante devido a sua influência na qualidade de destilados⁴⁰. O conhecimento atual está em quase sua totalidade baseado nos estudos realizados com tonéis de carvalho. Novamente no caso da aguardente brasileira os desafios são estimulantes, pois existe uma ampla gama de madeiras nativas e que são utilizadas no processo de envelhecimento de bebidas de forma não padronizada.

Conforme já antecipado neste trabalho, durante o processo de envelhecimento a composição química da aguardente passa por diversas mudanças, devido às reações que ocorrem no próprio destilado, sejam estas entre os compostos do próprio destilado, quer entre estes e os compostos extraídos da madeira^{40,41}. Também não devem ser negligenciadas alterações que venham a ocorrer devido permeabilidade dos tonéis, que envolvem a perda de moléculas voláteis como também a oxigenação do destilado que envolve várias reações de oxidação^{40,41,42}. Como exemplo positivo pode-se citar a diminuição do teor de dimetilssulfeto (CH_3SCH_3), composto sulfurado proveniente da decomposição de aminoácidos sulfurados^{40,43}, durante o processo de fermentação, e cuja presença é relacionada como um frequente defeito em aguardentes mais jovens. Em amostras de uísque foi observado uma diminuição dos teores de dimetilssulfeto em até quatro vezes num período de 5 anos de envelhecimento⁴⁰.

A influência do oxigênio que permeia pelos poros da madeira, é importante, mas trata-se de um assunto que divide opiniões^{42,44}. O comportamento físico-químico das aguardentes armazenadas em recipientes de vidro e em recipientes de madeiras^{45,46} conduz a características químicas e sensoriais diferentes. Em função do tempo, variações significativas ocorrem na composição química das aguardentes armazenadas em recipientes de madeira.

Para amostras armazenadas em recipientes de vidro, a exceção à concentração de acetato de etila⁴⁷, estas diferenças são menos pronunciadas. Isto se deve ao fato das reações de esterificação terem lugar também durante o armazenamento, mesmo que em recipientes inertes e em condições que dificultem trocas com o meio externo.

O esquema 1 e 2 exemplificam reações que ocorrem em ambos os tipos de recipientes (madeiras e outros inertes). O esquema 1 mostra a reação do ácido acético com o etanol, gerando o acetato de etila, o ester majoritário em aguardentes.

Esquema 4 – Reação do ácido acético com etanol gerando acetato de etila durante o processo de maturação.

O esquema 2 ilustra a reação de etanol com acroleína gerando 1,1,3- trietoxipropano. A acroleína já foi sugerida como um marcador de envelhecimento, seu emprego num modelo real nunca foi reconhecido.⁴⁸

Esquema 5 – Reação da acroleína durante o período de maturação.⁴⁸

Entre os compostos extraídos dos tonéis, aqueles relacionados com a degradação da lignina encontram-se entre os mais relevantes os aldeídos aromáticos, os ácidos fenólicos e os aldeídos cinâmicos que são considerados responsáveis por muitas das características imprimidas à bebida pelo processo de envelhecimento. O Esquema 3 exemplifica algumas reações que podem ocorrer com compostos fenólicos provenientes da etanólise da lignina durante o processo de envelhecimento.

Esquema 6 – Seqüência de reações de para conversão de compostos fenólicos relacionados à lignina durante o processo de estocagem em tonéis de madeira, onde k_i e k'_i ($i=1,2,3,\dots$) são constantes de velocidade específica para as reações de conversão.⁴⁰

Conforme esperado, madeiras diferentes devem contribuir de forma diferente para o perfil químico da aguardente. Assim, a análise cromatográfica de diferentes extratos de madeiras: jatobá, amendoim, cabreúva parda, castanheira, pequi, canela sassafráz e carvalho, indicam que para os compostos estudados a maior diferença entre as madeiras brasileiras e o carvalho reside nos teores dos compostos cumarina, catequina, siringaldeído, e coniferaldeído⁴⁹. Tais dados merecem atenção também do ponto de vista de saúde, pois a cumarina como já mencionada é classificada como tóxica, e elevados teores de cumarina foram detectados em amostras de jatobá (12 mgL^{-1}) e carvalho (2 mgL^{-1}).

É interessante a comparação entre a capacidade e a atividade antioxidante de aguardentes envelhecidas em madeiras brasileiras e em carvalho. A oxidação de lipídios se inicia com a formação de radicais livres, e os hidroperóxidos formados podem causar

alterações indesejáveis em óleos, gorduras ou alimentos. Além disto, os produtos da oxidação lipídica podem desencadear reações de peroxidação, que resultam em problemas para saúde. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERO), porém a membrana celular é uma das mais atingidas. A peroxidação lipídica é o processo através do qual espécies reativas de oxigênio atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidios das membranas das células^{50,51}. O esquema 4 exemplifica as principais etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica.

Esquema 4- principais etapas envolvidas no processo de peroxidação lipídica (LH- ácido graxo polinsaturado; OH• ou LO•- radical alcóxila; L• -radical lipídico;LOO• - radical peróxila).

Portanto compostos que possam interromper a propagação deste ciclo apresentam características antioxidantes. Os extratos etanólicos de madeiras foram avaliados em experimentos em que foi medido o efeito antioxidante. Estes se basearam na capacidade de captura e atividade junto ao radical semi-estável DPPH• como também na inibição da peroxidação lipídica iniciada por metmioglobina em uma emulsão água/óleo.

Estes parâmetros foram avaliados para diferentes extratos de aguardentes preparados a partir de carvalho e de madeiras brasileiras (Figura 5). As madeiras brasileiras apresentam um poder de inibição do processo de peroxidação lipídica induzida por metmioglobina, superior

ao do carvalho⁵². Entretanto os extratos de carvalho possuem maior capacidade e rapidez de captura de radicais peroxila que os extratos das madeiras brasileiras.⁵²

Figura 5- Histograma indicando a média do consumo de oxigênio para cada espécie.

Índice abaixo da unidade indica um efeito antioxidante.⁵²

Assim as características sensoriais positivas das madeiras jatobá e amendoim somam-se agora às suas propriedades antioxidantes. Algumas madeiras tradicionalmente utilizadas no envelhecimento da aguardente como canela-sassafráz, castanheira e louro-canela, apresentaram efeito contrário, ou seja, pró-oxidante, e principalmente no caso da primeira, seu uso não seria recomendável.

Experimentos eletroquímicos, embora sem identificar quais os compostos envolvidos, indicaram que extratos de carvalho e de cabreúva-parda apresentam capacidade antioxidante semelhante entre si.⁵³

A composição química de aguardente envelhecida quando interpretada com auxílio da análise quimiométrica permite identificar e classificar o tipo de madeira dos tonéis utilizados no envelhecimento de bebidas. Assim por exemplo em trabalho realizado anteriormente e aqui nesta exemplar discutido⁴⁹, foram utilizados com resultados não tão satisfatórios, os valores

de concentração de 16 compostos fenólicos e cumarinas para classificação de tonéis construídos com diferentes madeiras. O emprego de um “fingerprint cromatográfico” em associação com a análise dos componentes principais (PCA) permitiu a distinção entre as diferentes espécies de madeiras utilizadas na confecção de toneis. A identificação de picos cromatográficos referentes aos compostos que possam vir a ser possíveis marcadores de autenticidade, e a identificação destes mesmos picos foi realizada por meio de cromatografia líquida associada a espectrometria de massas. Assim, a cumarina revelou-se como um composto determinante para a classificação de amostras de jatobá, o ácido elágico para classificação de carvalho, e o 5-Hidroxi-metilfurfuraldeído para as madeiras cabreuva-parda e amendoim.^{13,49}

A capacidade de diferenciar madeiras empregadas no envelhecimento de aguardente (amburana, jequitibá, balsamo e carvalho) através da infusão direta da amostra em ionização por eletrospray associada a espectrometria de massas no modo negativo(ESI(-)-MS) também foi investigada⁵⁴. A aplicação da análise de componente principal permitiu classificar as madeiras empregas no envelhecimento baseando-se nos íons diagnósticos para cada uma. A naringenina e a pectolinarigenina se apresentaram como marcadores da cachaça envelhecida em amburana, ácido caprílico, ácido capríco e liquiritigenina como marcadores das cachaças envelhecidas em jequitibá, genisteína, biocanina e genisteína como marcadores da madeira de bálsamo e o ácido elágico e o etil galato como compostos responsáveis pela caracterização das aguardentes envelhecidas em carvalho⁵⁴. Algumas estruturas moleculares estão exemplificadas na Figura 6

Figura 6- Estrutura molecular de alguns compostos encontrados em madeiras brasileiras e carvalho.

Embora as técnicas acima mencionadas sejam de grande valia para a compreensão, o controle da identificação de espécies de madeira atualmente é realizado por especialista, de forma comparativa e visual, através de consultas a xilotecas e a livros especializados. Atualmente a identificação de madeiras se dá através de análise visual que é realizada considerando principalmente os seus órgãos reprodutores (flores e frutos), e também outras características morfológicas da árvore (casca, folhas, etc.) e mesmo em alguns casos pela análise do seu aroma⁵⁵. Em muito a experiência do profissional influi nesta análise. O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) recomenda efetuar a identificação através do seguinte quesito “Consiste no exame da estrutura anatômica da madeira pelo aspecto macroscópico (10X) e microscópico (40 a 400X), cujo método é o mais seguro para a identificação correta da madeira”⁵⁶. A Figura 7 ilustra um caso onde a habilidade do analista é

requerido. A Figura mostra duas espécies diferentes da mesma família e que são facilmente confundidas por similaridades dos seus troncos.

Figura 7- Exemplo da análise realizada considerando características morfológicas para diferenciar uma amostra de maparajuba (*Manilkara bidentata ssp. Surinamensis*) e uma amostra de maçarandubinha (*Manilkara paraensis*) que são facilmente confundidas.⁵⁷

Além de toda a diversidade de madeiras exploradas no país para o envelhecimento da aguardente brasileira assim como para outras bebidas destiladas o produtor da aguardente pode fazer uso de caramelo para correção de cor nas aguardentes envelhecidas. Segundo a legislação, o uso deste “aditivo” pode ser efetuado, sem a necessidade de informar sobre o seu teor¹⁸ e tão pouco sua composição. Embora no mercado existam diversos tipos de de caramelo, suas formulações e a composição não são declaradas no rótulo, sendo classificados somente por códigos. A metodologia recomendada pelo MAPA para análise de caramelo⁵⁸ avalia qualitativamente somente sua presença positiva ou negativa utilizando o teste que se baseia na intensidade da cor utilizando.

A comparação do espectro eletrônico na região do UV-vis para amostras adicionadas de caramelo, de amostras envelhecidas em carvalho e certificadas (padrão de referência) permite identificar a presença e quantificar o teor de caramelo em bebidas⁵⁹. Assim, por esse procedimento é possível estimar o teor de caramelo presente nas aguardentes, e ainda informar se a amostra esteve em contato com a madeira de carvalho. Foram avaliados os teores de caramelo em amostras de uísque americano, uísque escocês e conhaques finos constatando-se que as amostras dos uísques escoceses apresentaram teores de caramelo⁵⁹ superiores as demais. Por sua importância no quesito envelhecimento, o caramelo, se inclui no grupo de itens a serem controlados, podendo indicar se a bebida foi mesmo envelhecida em carvalho ou simplesmente adicionada de caramelo. Vale ressaltar que a adição de caramelo não é geralmente praticada utilizada por pequenos e médios produtores.

Certamente a aguardente brasileira, necessita de mais atenção e de investimentos tanto dos setores privados e do público para atingir seu status de bebida de qualidade. Para tanto é necessário uma melhor definição dos padrões que correspondam à qualidade de uma bebida corretamente envelhecida. Embora a aguardente brasileira envelhecida ainda não possua a devida atenção com relação a suas características sensoriais e sua composição química, os primeiros passos foram dados. É longo o caminho a percorrer, mas isto só poderá ser alcançado através da união de todos os setores responsáveis pela qualidade de aguardente brasileira, fato este que irá contribuir significativamente para a aceitação e a consolidação do *status* de nossa bebida nacional.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A certificação de produto com controle de toda cadeia produtiva é item necessário em bebidas de alto nível, e a aguardente brasileira ainda explora pouco as ferramentas disponíveis para tal exercício. Atualmente, a certificação de bebidas envelhecidas é feito através de constantes auditorias e a identificação das madeiras utilizada no envelhecimento é ainda ditada pela conferência de documentos emitidos pelos fornecedores. A elaboração de metodologias que venham a auxiliar o processo de identificação de madeiras é de interesse num futuro planejamento de certificação da cadeia produtiva da cachaça. Assim, procurando contribuir neste escopo pretende-se desenvolver metodologias simples e acessíveis que permitam identificar as madeiras em que bebidas foram armazenadas.

Para isto, será efetuada a análise cromatografica (HPLC-DAD) de extratos de madeiras, com a finalidade de identificar possíveis marcadores de espécies. Também será utilizado o espectro eletrônico na região do UV e utilizando ferramentas quimiométricas explorar o poder de separação entre as espécies em função dos devidos espectros. Assim, modelos irão ser elaborados e sua autoconsistência testada com amostras comerciais envelhecidas e em diferentes tipos de madeiras devidamente certificadas.

Adicionalmente, além da extensão no controle de qualidade de outros destilados envelhecidos, esta metodologia poderia ser útil para a identificar espécies de madeira para o uso em marcenaria, ou mesmo para fins de controle de exploração ilegal.

Portanto modelos que possam auxiliar na identificação de madeiras em situações em que nem sempre se pode contar com a presença de um especialista para tal atividade devem ser estimuladas e desenvolvidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico e ou pureza cromatográfica e adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ EUA). A água utilizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) foi destilada e posteriormente deionizada em um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA EUA).

3.2. Amostras de madeiras

A amostra de cachaça devidamente certificada pelo produtor, não envelhecida (47%v/v), sem adição de açúcar e utilizada na preparação dos extratos, foi gentilmente doada por um grande e tradicional produtor do Estado de São Paulo. As amostras de amendoim (*Pterogyne sp.*), louro-canela (*Aniba parviflora*), jatobá (*Hymenaea courbaril*), canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), jequitibá-rosa: *Cariniana legalis*: jequitibá-branco: *Cariniana estrellensis*) e cabreúva-parda (*Myrocarpus frondosus*), bálsamo (*Myroxylon balsamum*), amburana (*Amburana cearensis*) e castanheira (*Bertholletia excelsa*) foram cedidas pelos Laboratórios de Madeiras e Estrutura de Madeiras da Universidade de São Paulo. As amostras de carvalho (*Quercus sp.*) devidamente certificadas foram cedidas pelo Prof. John Piggot do Departamento de Biociências de Strathclyde (Escócia, Glasgow).

3.3. Preparo dos extratos

Seguindo procedimento anteriormente por^{49,52} as amostras de madeiras foram moídas e o pó peneirado de forma a obter partículas de 100 mesh de diâmetro. Estes materiais foram então extraídos com cachaça não envelhecida com graduação alcoólica de (47%v/v; pH = 4,7 $\pm$ 0,2), na proporção 0,010g/mL. O processo de extração foi realizado durante 26 dias sob agitação constante em uma mesa agitadora da marca Tecnal modelo TE - 14, a temperatura ambiente (25 $\pm$ 2) °C e ao abrigo da luz. As amostras, sempre em duplicatas, após preparadas foram filtradas em papel de filtro quantitativo e armazenadas a temperatura ambiente. No total foram preparados 93 extratos, sendo 13 de carvalho, 8 de amendoim, 9 de jatobá, 8 de cabreuva parda, 10 de amburana, 12 de bálsamo, 5 de canela-sassafráz, 12 de castanheira, 5 de louro canela e 2 de canela sassafrás. As amostras foram selecionadas baseadas em sua utilização, representatividade e disponibilidade no mercado. Foram testadas 50 amostras de cachaças envelhecidas em diferentes tipos de madeiras. O conjunto de cachaças envelhecidas testadas foi assim contruido: 9 de carvalho, 6 de amburana, 6 de amendoim, 10 de bálsamo, 2 de cabreúva parda, 3 de canela-sassafráz, 5 de castanheira, 7 de jequitibá, 1 de louro-canela e 1 de jatobá.

3.4. Espectros eletrônicos (UV-vis)

Os espectros de absorção para as amostras, na região de 200 nm a 400 nm, foram coletados em um espectrofotômetro HP 8152A com resolução de 2 nm e utilizando-se de cubetas de quartzo de caminho ótico de 1cm (Hellma, Müllheim, Germany). Com a finalidade de normalizar os resultados, quando necessário as amostras foram diluídas em etanol/água

40% v/v com o objetivo de se ajustar o valor da absorbância obtida em 220 nm ao valor unitário.

3.5. Condições Cromatográfico

Os cromatogramas foram obtidos por injeção direta da amostra em cromatógrafo para fase líquida Shimadzu modelo 10 AD equipado com um detector de arranjo de diodo modelo SPDM6A, operando em 280 nm, utilizando uma coluna C-18 Shimpack com dimensões de 2 mm x 250 mm x 4,6 µm, acoplada a uma pré-coluna Shim-pack CLC G-ODS (30 mm x 4,6 mm). O injetor utilizado foi Rheodyne modelo 7725i, com alça de amostragem de 5 µL. A fase móvel com vazão de 0,4 mL/min consistia em uma mistura de solventes: A (água/ ácido acético 98:2% v/v) e B (metanol/água/ ácido acético, 70:28:2% v/v), utilizando gradiente de eluição com a seguinte programação: 0-3min: B 0% em A; 3-25min: B 40% em A, 25-43min: B 60% em A, 43-55min: B 60% em A, 55-60min: 80% B em A; 60-65min: 80% B em A; e 65-69min: 0% B.

3.6. Análise dos fragmentogramas via inserção direta.

As amostras foram injetadas diretamente em espectrometro de massas tipo “ion trap” Bruker Datonics modelo Esquire utilizando uma bomba seringa Kdscientific modelo KDS-100-CE num fluxo continuo de 60 µL/hora.

3.7. Análise multivariada

3.7.1. Tratamento dos dados espectrais

Os dados espectrofotométricos foram normalizados como forma de pré-tratamento, para que cada variável possa ter o mesmo peso em sua contribuição na elaboração do modelo. Após este procedimento foi aplicado a primeira derivada ($dA/d\lambda$) como pré-tratamento. Este procedimento tem por objetivo minimizar variações na linha de base dos espectros em função das condições de obtenção do espectro, tais como variação de temperatura, solvente utilizado entre outros interferentes⁶⁰. Os dados gerados foram aplicados na construção de uma matriz 93 linhas x 90 colunas. As linhas correspondem as 93 amostras e as colunas aos dados de absorbância (220-400 nm a cada 2 nm) para cada uma destas amostras (extrato). Foi então aplicado a análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de cluster (HCA) e análise discriminante linear (LDA)

Na análise multivariada os dados são arranjados em uma matriz $X_{n \times p}$, de n objetos, arranjados nas linhas e p variáveis, arranjadas nas colunas. Os objetos podem ser: amostras, moléculas, materiais, indivíduos, etc.

As variáveis podem ser absorbâncias em diferentes comprimentos de onda, sinais analíticos em função do potencial elétrico ou do tempo de retenção, concentração de elementos ou outras propriedades físicas.

A análise de PCA consiste em identificar dentro de um hiperespaço qual direção que contém o maior número de informações. Por meio de projeções dos resultados analíticos de cada amostra no espaço formado pelas novas componentes principais é possível demonstrar diferenças entre as amostras utilizadas. (gráficos de scores) determinando quais as principais variáveis envolvidas (gráfico de loading).

A HCA é um método de análise exploratória que busca classificar diferentes objetos dentro de um grupo, de modo que o grau de associação entre dois ou mais objetos seja máximo se pertencerem ao mesmo grupo (cluster) ou mínimo se forem diferentes. A HCA pode ser usada para observar comportamentos, porém não fornece explicação sobre estes, ou seja, este tipo de análise agrupa as amostras, porém sem dar informações de como as agrupou.

O modelo de classificação foi elaborado utilizando análise discriminante linear (LDA). A LDA é um procedimento de classificação que maximiza a variância entre as categorias e minimiza a variância dentro das categorias. Este método torna um número de funções ortogonais discriminantes lineares iguais ao número de categorias menos um ($n-1$).^{60, 61}

Foram testadas 50 cachaças para validação do modelo de análise discriminante linear (LDA), aplicando validação cruzada (Tabela 6 apêndice 1). Na validação cruzada (leave-one-out) uma amostra é retirada aleatoriamente do conjunto de dados, e um novo modelo é gerado com as amostras ($n - 1$) restantes (modelo de calibração). A amostra retirada é testada fornecendo uma primeira validação do modelo criado. Esse processo será obtendo-se então “n” modelos. Para cada amostra retirada, um modelo é criado e testado. a exatidão em classificação do modelo para “n” validações e testes é então determinada.^{60, 61}

Foram desenvolvidos dois modelos, como será discutido na seção 4. Um contemplando somente extratos de madeiras e outro considerando cachaças comerciais.

A análise multivariada (PCA) foi realizada utilizando os softwares The Unscramblers V9.8. A análise hierárquica de cluster e a análise discriminante linear foram realizadas utilizando o programa MINITAB Statistical Software versão 14.

3.7.2. Tratamento dos dados cromatográficos

O conjunto de dados obtidos por análise cromatográfica foi primeiramente reduzido a um numero menor de pontos, para a adequação operacional dos software utilizados. Após este passo os cromatogramas foram alinhados para remover eventuais deslocamentos de picos cromatográficos oriundos de pequenas oscilações das condições de análise utilizando o algoritmo COW (Correlation Optimization Warping) ⁶². Foi então realizado alinhamento da linha de base pelo método MSC (multipe scattering curve) e construída uma matriz com 18 linhas x 300 colunas.

3.7.3. Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas (HPLC-ESI-MSⁿ)

Os extratos foram analisados em um cromatografo para fase líquida da Shimadzu modelo Prominence, equipado com duas unidades de bombeamento de solvente (bombas) modelo 20 D, injetor manual Rheodyne 8125 com um loop de 20 µL. A coluna e as condições cromatográficas utilizadas são as mesmas referentes a descrita para o método HPLC-DAD.

Os espectros de massa foram coletados nos modos positivo e negativo via ionização por “eletrospray” em um espectrometro de massa do tipo “ion trap” Bruker Datonics modelo Esquire. As condições de ionização estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1- Parametros utilizados no analisador de espectrometria de massas

Parametros	Modo ESI(-)	Modo ESI(+)
Accumulation time (ms)	30	30
Averages	5	5
Scan range (m/z)	70-500	70-500
Ion charge control target	10000	30000
Trap drive	52.0	45.3
Skim 1 (V)	-21.6	+21.6
Skim 2 (V)	-6.0	6.0
Octapole radiofrequency (Vpp)	150.0	150.0
Lens 1 (V)	+5.0	-5.0
Lens 2 (V)	+60.0	-60.0
Octopole (V)	-2.88	+2.88
Capillary Exit (V)	-76.6 Volt	-76.6
Capillary Exit Offset (V)	-68.6	+68.6
High-voltage capillary (V)	+2800	-2800
Dry gas temperature (°C)	365	365
Dry gas (L/min)	9.00	9.00
Nebulizer (psi)	40.0	40.0
Octapole Δ	-2.40	+2.40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise multivariada aplicada aos cromatogramas obtidos HPLC-DAD (280 nm)

Esta etapa é consequência natural do trabalho de investigação da composição e das características químicas das madeiras brasileiras e do carvalho realizado durante o período de mestrado⁶³. Naquela ocasião a composição fenólica e cumarica de amostras de extratos de madeiras brasileiras foram investigadas. O tema foi expandido utilizando ferramentas quimiométricas, pois simplesmente os teores dos dezesseis (16) compostos fenólicos e cumaricos “per se” não foram suficientes para alcançar a desejada separação dos extratos das diferentes espécies de madeiras.

A abordagem empregada consiste na utilização de todo o perfil cromatográfico (“*fingerprint*”) obtido de cromatogramas obtidos em cromatógrafo para fase líquida acoplado a um detector de arranjo de diodo, operando em 280 nm. Optou-se por trabalhar com o $\lambda = 280$ nm por ser este um comprimento de onda onde absorvem muitos dos compostos extraídos durante o processo de maturação de bebidas. Também decidiu-se nesta fase exploratória utilizar um número reduzido de amostras.

Primeiramente os resultados extraídos dos cromatogramas oriundos das eluições cromatográficas foram submetidos a uma redução de número de pontos. Isto porque os cromatogramas obtidos experimentalmente são compostos de aproximadamente 3.000 pontos e os programas MINITAB e Unscrambler utilizados não comportam tal número de variáveis. Para tanto foi utilizado um algoritmo, o qual foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Sistema de Energia Elétrica (EESC-USP) que permitiu a redução do número de pontos a 300, porém sem prejuízo da definição dos picos cromatográficos oriundos das separações analíticas.

Durante o processo de eluição, algumas variações podem ocorrer no tempo de retenção de alguns compostos devido a diversos fatores como pressão do sistema e temperatura. Tais deslocamentos podem interferir negativamente nos resultados quimiométricos, pois um pico deslocado pode ser entendido como que indicando a presença de outro composto e erroneamente ser considerado um descritor químico durante o processo de aplicação da análise multivariada.

Após a redução no número de pontos aplicou-se a análise de componentes principais aos perfis cromatográficos obtidos pelo monitoramento a $\lambda=280$ nm. Isto permitiu agrupar 25 extratos de madeiras utilizados em 6 grupos (11 carvalho, 3 amendoim, 4 cabreúva-parda, 2 canela sassafráz, 2 pequi e 3 jatobá).

A distinção de 6 cluster independentes são observados nos gráficos de score da PCA (Figura 8)

Figura 8- Gráficos de score para PCA (PC1 x PC2) dos extratos etanólicos de madeiras avaliados por HPLC, a partir da análise do *fingerprint* cromatográfico ($\lambda=280$ nm).

A soma das 3 primeiras PCs explicam 75% da variância dos dados (PC1 52%, PC2 13% e PC3 10%). Os dados da PC1 permitiram separar os extratos de jatobá das demais madeiras. Quando se analisa um gráfico de *loading* usando um perfil espectral ou cromatográfico, uma possibilidade interessante é a de plotar-se os valores de loading versus as variáveis. No caso explorado nesta discussão, foram utilizados valores de *loading versus* tempo de retenção. Portanto, as variáveis (tempo de retenção) mais importantes apresentam os maiores valores, e como os tempos de retenção estão relacionados com os picos cromatográficos pode-se determinar quais compostos são mais relevantes na PCA. Os gráficos de *loading* (PC1 vs tempo de retenção) gerados a partir do perfil cromatográfico dos extratos de madeira, mostram dois picos com elevados valores de *loading* que contribuem na separação observada na PC1 (Figura 9).

Figura 9- Gráfico de loading para os valores da PC1, onde se observa os picos com maiores valores e seus respectivos tempos de retenção.

Um dos picos eluindo em 31,1-31,7 minutos, anteriormente atribuído a presença do composto epicatequina, teve sua identificação revista, agora fazendo-se uso de um

cromatografo para fase líquida acoplado a um espectrometro de massas de multiplos estagios “íon trap”. O segundo pico eluindo em 38,6-39,4 minutos foi identificado como sendo cumarina (1,2-benzopirano).

Como os valores de PC1 foram elevados, e deram origem a uma separação entre os extratos de jatobá dos demais extratos de madeiras, a diferenciação para os extratos de carvalho, amendoim, cabreúva-parda, canela sassafráz e pequi foram realizadas utilizando-se os valores da PC2 e PC3 (Figura 10).

Os extratos de carvalho e cabreúva-parda foram diferenciados entre si baseados nos respectivos valores de PC2. Os gráficos de loading para PC2 (Figura 11) mostram a presença de um pico não identificado com alto poder de discriminação, eluindo entre 45.7-47.0 minutos, para os extratos de cabreúva-parda. Também fica evidente neste mesmo gráfico e a presença do composto ácido elágico para os extratos de carvalho, eluindo entre 52.1-53.8. Estes dois picos são determinantes para discriminação destas duas espécies.

Figura 10- Gráfico de scores (PC2 13% x PC3 10%) para os extratos etanólicos obtidos a partir dos cromatogramas ($\lambda=280$ nm).

Os extratos de cabreúva-parda, amendoim e canela sassafráz também podem ser diferenciados entre si pelos seus respectivos valores de PC2. Os gráficos de *loading* na PC2 (Figura 11) mostram que a presença de cumarina ($t_r=38.2-39.2$ min.) e de outros três compostos ainda não identificados eluindo entre os tempos de retenção de 48.1 a 51.7 são importantes para a identificação da canela sassafráz ao passo que os picos com tempo de retenção 10,3 a 11,7 minutos permitem a discriminação dos extratos de amendoim. O composto correspondente a este pico é o principal descritor para a diferenciação entre os dois extratos. O pico observado na amostra de amendoim foi identificado por meio de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodo, como sendo 5-(hidroximetil) ($t_r=10,3-11,7$ min.).

Figura 11- Gráfico de loading para os valores da PC2, onde se observa os picos com maiores valores e seus respectivos tempos de retenção.

Os valores de PC3 são os responsáveis pela diferenciação entre os extratos de pequi e um segundo grupo formado pelos extratos de canela sassafráz e amendoim e um terceiro grupo composto pelos extratos de cabreúva-parda e carvalho (Figura 12). Os extratos de pequi mostram um perfil único quando comparado aos demais extratos, mostrando quatro picos mais relevantes. Um dos picos eluindo no tempo de retenção de 25,7 minutos, foi atribuído a presença *p*- hidroxibenzaldeído e os dois picos eluindo em 30,70 e 33,1 minutos foram respectivamente identificados como vanilina e siringaldeído. O quarto pico com tempo de eluição de 36.3 minutos não foi identificado até o presente momento. Ainda com respeito aos valores de PC3, o ácido elágico e um pico ainda não identificado eluindo em 53,8-55,3 minutos foram os responsáveis pela discriminação entre amostras de cabreúva-parda e a amostras de carvalho.

Figura 12- Gráfico de loading para os valores da PC3, onde observa-se os picos com maiores valores e seus respectivos tempo de retenção.

O uso de *fingerprint* cromatográfico é atualmente recomendado por autoridades como WHO (world health organization), FDA (Food and Drug Administration) e EMEA (European Medicine Agency) como uma ferramenta para reconhecimento de padrões e controle de qualidade de sistemas multicomponentes. A aplicação desta técnica nas amostras dos extratos etanólicos de madeiras mostrou-se a primeira vista muito promissora para identificação da espécie de madeira utilizada no processo de envelhecimento de destilados. A associação do perfil cromatográfico com a análise multivariada mostrou-se importante para diferenciar os extratos etanólicos de madeiras e discriminar os picos cromatográficos mais relevantes através dos gráficos de PCA. Do ponto de vista forense o uso do *fingerprint* pode auxiliar decisivamente na busca de biomarcadores de espécies e certamente poderá ser estendido para identificação de madeiras em um âmbito bem maior do abordado até aqui.

4.2. Identificação cromatográfica

Conforme abordado no item anterior deu-se sequência a identificação e a quantificação de compostos fenólicos e cumáricos num contexto confirmativo utilizando cromatografia de fase líquida acoplada a um detector de massas de múltiplo estágios (HPLC-ESI-MSⁿ). Casos onde foi observada a coeluição de compostos de interesses como o caso do ácido gálico, do sinapaldeído, do coniferaldeído e do ácido elágico, a análise dos fragmentos gerados ajudaram na confirmação ou não dos compostos propostos anteriormente.⁶³ A análise dos isômeros catequina e epicatequina anteriormente realizada via cromatografia de fase líquida acoplada a detector de fluorescência, constitui-se em um exemplo disto.

A epicatequina foi observada e quantificada através do monitoramento dos pico cromatográfico nos comprimentos de onda λ_{EM} = 280 e λ_{EX} = 313. A utilização desta técnica conduziu a atribuição e quantificação equivocada de um pico cromatográfico eluindo no tempo de retenção de 31,1-31,7 minutos como sendo devido a presença da epicatequina. Sua confirmação utilizando HPLC-MSⁿ não se verificou. A epicatequina (massa molar= 290,26) quando analisada no modo negativo apresenta além dos fragmentos do seu pseudo-íon molecular m/z 289 [M-H]⁻ também fragmentos “filhos” caracterizado pelo fragmento 289→245 m/z atribuído a perda de $-(CH_2OH)$ e ao fragmento 289→271 m/z atribuído a perda de H₂O. A observação do perfil dos fragmentogramas mostra a presença de compostos de massa molecular elevada, acima de 500 u.m a qual até o presente momento ainda não foi elucidada.

A presença do isômero catequina por sua vez pode ser confirmada conforme os resultados anteriores obtidos por HPLC-DAD-Fluorescência. A confirmação ocorreu por meio da análise do pico correspondente a catequina eluindo no t_R = 26,3-27,1 minutos. Sua caracterização foi realizada baseando-se na análise dos fragmentos gerados no modo negativo e positivo. O modo negativo se mostrou mais sensível no caso dos compostos fenólicos,

devido a maior facilidade destes compostos perderem um hidrogênio^{64,65} e portanto a observação do pseudo-íon molecular $[M-H]^-$ ser favorecida. A identificação da catequina foi realizada pela observação do seu pseudo-íon molecular m/z 289 $[M-H]^-$. A presença do fragmento m/z 245 ($289 - (-CH)_2OH$) da origem a um fragmento muito estável e de alta intensidade. O fragmento m/z 271 ($289 - (H_2O)$) refere se a perda de uma molécula de H_2O , como observado na Figura 13 que representa o fragmentograma gerado no modo negativo (condições experimentais ver seção 3, materiais e metodos) que confirmam a identidade da catequina.

Figura 13- Fragmentograma do pico relativo a catequina no modo negativo ESI (-) em uma amostra de extrato de amendoim, nota-se os íons característicos da fragmentação da catequina (m/z : 289, 271 e 245).

Os fragmentos tanto para catequina como para epicatequina são os mesmo pois ambos os compostos são isômeros.⁶⁶

Devido a coeluição do sinapaldeído e do coniferaldeído quando se utiliza detector espectrofotométrico, suas presenças não haviam ainda sido elucidadas. O uso de de HPLC-MSⁿ permitiu a identificação e a quantificação destes compostos de forma inequívoca. A função “cromatograma do ion extraído”, adjunta do software Bruker Daltonics Compass 1.1

for esquire / HCT, possibilitou selecionar a massa do íon de interesse agindo como um “filtro” para os demais íons do cromatograma. Isto somado ao conhecimento dos devidos tempos de retenção e a adição de padrão confirmaram a presença de ambos os compostos.

O coniferaldeído foi confirmado pela presença do seu pseudo íon molecular 177 $[M-H]^-$ e pelos fragmentos 147 m/z ($177 \rightarrow 147 m/z$) atribuído a perda da molécula ($-CHCO$) e 162 ($177 \rightarrow 162 m/z$) atribuído a perda da molécula de ($-CH_3$). Para o sinapaldeído a presença do pseudo íon molecular 207 $[M-H]^-$ e o fragmento 151 ($207 \rightarrow 151 m/z$) atribuído a perda de ($-CHCO$) como também a presença do fragmento 166 m/z ($207 \rightarrow 166 m/z$) atribuída a perda de ($-CH_3$) confirmam a presença deste aldeído cinâmico nas amostras analisadas conforme apresentado na Tabela 1.

Quando se faz uso de técnicas espectrofotométricas, a quantificação de ácido gálico pode ser comprometida em cromatografia de fase reversa devido a sua hidrofiliabilidade. Em muitos casos, dependendo do gradiente de eluição, este composto elui muito próximo ao tempo morto. No presente trabalho, o baixo tempo de retenção ($t_R = 4,6-5,3$ minutos) e a possível presença de compostos coeluintes nesta região, conforme foi observado nos cromatogramas dificultam a sua quantificação (Figura 14). Com o uso de HPLC-ESI-MSⁿ foi possível identificar e quantificar o ácido gálico sem interferências dos demais compostos. A presença do pseudo íon molecular 272 m/z $[M-H]^-$ e do fragmento 124 m/z ($m/z 272 - CO_2$) confirmam a identidade do pico como sendo devido a presença do ácido gálico.

Figura 14- Amostra de extrato de carvalho exemplificando a dificuldade de se quantificar o ácido gálico em detector espectrofotométrico ($\lambda = 280$ nm) no gradiente de eluição empregado (vide secção2).

O ácido elágico, composto relacionado com a hidrólise de elagitaninos em bebidas, comum nos extratos de carvalho⁶⁷, foi facilmente identificado e quantificado via HPLC-DAD em quase todas as amostras, exceção das amostras de castanheira. Estas amostras apresentavam um pico cromatográfico correspondente a um composto até o presente momento não elucidado, coelundo com o ácido elágico. Através do uso de HPLC-MSⁿ e da função “cromatograma do íon extraído”, foi possível isolar o pico corresponde ao ácido elágico e quantifica-lo nestas amostras. A Figura 15 ilustra o cromatograma típico de um extrato de castanheira onde se observa a coeluição descrita para o pico do ácido elágico. A Figura 16 representa o cromatograma do íon extraído do ácido elágico e a Figura 17 o fragmentograma correspondente ao ácido elágico.

A Tabela 2 apresenta os principais fragmentos utilizados para identificação dos compostos analisados como também seus ϵ_{max} e os pseudos-íons moleculares nos modos positivo e negativo.

Figura 15- Cromatograma do extrato etanólico obtido por gradiente de eluição (vide seção 3) em HPLC-DAD ($\lambda = 280$ nm) de um extrato de castanheira, nota-se a coeluição do pico de ácido elágico com o de um composto desconhecido.

Figura 16- Cromatograma do íon extraído (íon selecionado m/z 301, modo negativo) obtido a partir do gradiente de eluição (vide seção 3) analisado por HPLC-ESI(-)-MSⁿ em uma amostra de castanheira.

Figura 17- Produtos da fragmentação do pseudo-íon molecular $[M-H]^-$ para o pico extraído referente ao ácido elágico operando no modo negativo (ESI(-)).

Tabela 2- Principais fragmentos para os picos identificados, m/z para os pseudos íons-moleculares nos modos negativos (ESI(-)) e positivos (ESI (+)), $\epsilon_{\max}$ para cada compostos e as espécies de madeiras onde estes compostos foram identificados.

Composto	$\lambda_{\max.}$ (nm)	[M-H] ⁻ (Frag. MS ² m/z)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Madeiras
Vanilina	290	151.1 → 137.1 (-CH ₃), 151.1 → 123 (-CO), 151.1 → 107 (-CO ₂)	153.1	151.1	Carvalho, cabreúva-parda, canela sassaáfraz, pequi, castanheira.
Eugenol	230	163.2 → 149 (-CH ₂), 163.2 → 137 (-C ₂ H ₂), 163.2 → 147 (-CH ₃),	165.2	163.2	Cabreúva-parda
Ácido gálico	272	169.1 → 124.9 (-CO ₂) 169.1 → 154.1 (-CH ₃)	171.1	169.1	Carvalho, jatobá, cabreúva-parda, pequi, castanheira canela sassaáfraz
Escopoletina	345	192 → 177 (-CH ₃) 177 → 159 (-H ₂ O)	193.3	191.3	Carvalho, jatobá
Catequina	280	289.3 → 245 ((-CH) ₂ OH) 289.3 → 271.3 (-H ₂ O) 289.3 → 179 ()	291.3	289.3	Amendoim, carvalho, cabreúva-parda, jatobá, canela sassaáfráz
Mirecetina	256	301 → 151 (RDA)	319.2	317.2	Amendoim, carvalho e canela sassaáfráz
Cumarina	280	145 → 117 (-CO) 145 → 118 145 → 90	147.1	145.1	Carvalho, cabreúva-parda, canela sassaáfraz, pequi, castanheira
Quercetina	256	301.2 → 257 (-CO ₂) 301.2 → 179 301.2 → 127 301 → 151 (RDA)	303.2	301.2	carvalho
Ácido vanílico	260	168 → 124 (-CO ₂) 168 → 153 (-CH ₃)	169.2	167.2	Carvalho, cabreúva-parda, canela sassaáfraz, pequi, castanheira
Siringaldeído	305	181 → 137 181 → 175 181 → 160	183.1	181.1	Carvalho, cabreúva-parda, canela sassaáfraz, pequi, castanheira
Ácido elágico	256	301.2 → 283 (-H ₂ O) 301.2 → 257 (-CO ₂)	303.2	301.2	Carvalho, canela sassaáfraz, pequi, castanheira

Tentativas de identificação utilizando o perfil cromatográfico via HPLC-ESI-MSⁿ de todos os picos observados via HPLC-DAD operando em 280 nm foram realizadas, porém sem muito sucesso. Em muitos casos alguns picos analisados apresentaram massas elevadas, que pode ser indícios de polimerização de compostos como catequina, que podem ocorrer durante o período de armazenamento⁶⁸. Um padrão espectral correspondente a dímeros e alguns casos até trimeros deste composto foram observado onde massas no valor de m/z 867 e fragmentos m/z 578 e m/z 289 podem ser evidências destas reações. Este fato está em estudo neste Laboratório.

4.3. Fingerprint de Espectrometria de massas por ionização por “eletrospray”.

Os extratos de madeiras foram também analisados via inserção direta em um espectrometro de massas coletando os íons no modo positivo ESI (-) e ESI (+). Os dados obtidos no modo negativos deram origem a uma matriz de 25 linhas X 5 colunas sendo as linhas correspondentes as amostras e as colunas aos íons selecionados. A seleção de íons teve como critério a sua intensidade nos fragmentogramas. Estabeleceu-se como parametro utilizar apenas os íons cuja intensidade fosse superior a 150.000 unidades de contagem. A aplicação da análise de componentes principais ao fragmentograma total via inserção deu origem a um espectro de massas muito complexo conforme exemplificado na Figura 18.

Figura 18-Espectro de massas obtido para uma amostra de carvalho via inserção direta.

A soma das duas primeiras PC somam 38% (PC1 28%, e PC2 10%) da explicação da variancia dos dados. A utilização dos 5 principais íons, que são apresentados na Tabela 3, como descritores mostrou através do gráfico de *scores* que a PC1 separou muito bem os extratos de carvalho das demais madeiras. A PC1 claramente permitiu separar os extratos de carvalho das demais madeiras brasileiras (Figura 19). As amostras de amendoim e de jatobá tendem a formar um grupo, quando se avalia os valores de PC1 e PC2. As amostras de jatobá, canela sassafráz e cabreúva-parda comportam-se de forma irregular, dispersando-se por todo o gráfico de PC1 vs PC2.

Figura 19- Gráfico de scores para a PC1 vs PC2 gerados a partir dos fragmentos gerados por ionização por “eletrospray” via inserção direta dos extratos etanólicos de madeiras.

O gráfico de *loading* gerados pela análise de PCA mostra que a presença do fragmento m/z 301 foi o principal descritor para as amostras de carvalho. Este fragmento corresponde ao pseudo-íon molecular do ácido elágico ($[M-H]^+$), anteriormente proposto como descritor para esta madeira nas análises via HPLC-DAD e confirmado via HPLC-ESI-MSⁿ. Para as três amostras de amendoim, uma de jatobá, uma amostra de cabreúva-parda e uma amostra de canela sassafráz a presença dos íons m/z 143 e m/z 171 foram os principais descritores, sendo responsáveis por estas amostras se agruparem ao lado direito do gráfico de scores na Figura 19. Em trabalho anterior⁶⁹, utilizando a mesma técnica aqui descrita, para diferenciação de aguardentes envelhecidas em diferentes madeiras, o íon de m/z 171 em amostra de jequitibá foi associado como pertencente ao ácido cáprico⁶⁹. A presença do íon m/z 143 foi associada com a presença de ácido caprílico (MM= 144).

Uma amostra de canela sassafráz, uma de cabreúva-parda e duas de jatobá apresentaram um perfil diferente das demais amostras das correspondentes espécies. Interessantemente, a amostra de canela sassafráz 1, apresentou como característica que a diferenciou das demais, os fragmentos m/z 271, m/z 313 e o fragmento m/z 377. Novamente verificou-se em consulta a literatura⁶⁹ que estes mesmos fragmentos são observados em aguardentes armazenadas em amburana e indicam a presença dos compostos narigenina (MM=272), pectolinarigenina (MM=314) e de um terceiro um composto não identificado. A Tabela 3 apresenta os íons selecionados para análise quimiométrica.

Tabela 3- Massa dos principais íons seleccionados para análise multivariada.

Tipo de madeira	Íons seleccionados				
	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
Amendoim 1	143.1	171.1	269	283.1	529.4
Amendoim 2	143.1	171.1	219	501.4	529.4
Amendoim 3	171.1	403.3	404.3	501.4	529.4
Canela sassafráz 1	271.1	313.1	377.1	521.2	523.2
Canela sassafráz 2	143.1	171.1	501.4	529.5	613.5
Carvalho 1	301	339.2	467.1	483.1	487.2
Carvalho 2	301	323.1	391.1	339.1	513.1
Carvalho 3	301	483.1	655.4	656.4	817.4
Carvalho 4	301	323.1	391.1	483.1	517.3
Carvalho 5	301	323.1	391.1	483.1	497.1
Carvalho 6	301	323	345	391.1	487.2
Carvalho 8	301	311.2	325.2	339.2	487.2
Carvalho 9	301	391.1	467.1	483.1	487.2
Carvalho 10	301	407.1	483.1	517.3	533.3
Carvalho 11	301	323.1	483.1	513.1	517.3
Carvalho 12	301	323.1	483.1	517.3	533.3
Carvalho 13	301	323.1	339.1	391.1	487.2
Carvalho 14	301	323	391.1	483.1	517.3
Jatobá 1	143.1	169	171.1	325.2	501.4
Jatobá 2	303.1	317.1	345.1	449.1	621.1
Jatobá 3	273.1	303	431.1	561.2	575.2
Cabreúva 1	233.1	267.2	287.1	303.1	515.3
Cabreúva 2	143.1	171.1	255.2	435.2	477.2

Em nossos estudos, o uso desta metodologia descrita nesta secção foi abordado de forma a fornecer uma comparação com as demais técnicas utilizadas neste trabalho (Uv-vis e fingerprint cromatográfico). Em linhas gerais, utilizando-se os íons diagnosticos de cada madeira tornou-se possível a separação entre o carvalho e as demais madeiras. Para o conjunto de dados inicialmente estudado, dentre as 3 técnicas utilizadas, a que apresentou os menores valores nas explicações dos dados de variância foi o método de inserção direta no espectrometro de massas. Embora metodologia similar tem sido descrita com sucessos em

outro banco de dados⁶⁹, para o presente banco de dados isto não foi observado. Uma possibilidade a ser considerada esta relacionada com a sensibilidade desta técnica, onde se observa um padrão total de íons presente nas amostras. Isto certamente é interessante quando se deseja identificar diferenças entre as espécies de um mesmo gênero. Porém, tal fato pode não ser tão relevante ou mesmo necessário quando se busca apenas observar padrões para uma espécie de madeira de forma a caracterizá-la.

4.4. Análise multivariada aplicada ao espectro eletrônico na região do UV-vis

Como ponto de partida foram realizados testes preliminares com um banco de dados restrito a 18 amostras, para avaliar a viabilidade de aplicação de análise multivariada aos resultados obtidos por três técnicas. Em uma etapa seguinte, o estudo seria estendido a um banco de dados maior. O uso do fingerprint cromatográfico e o fingerprint de massas gerados por ionização por “electrospray” já foram anteriormente comentados neste trabalho. Aqui aborda-se a utilização dos valores de absorbâncias dos espectros eletrônicos na região do UV-vis. Foram utilizados os espectros coletados de 18 amostras, construindo-se uma matriz de 18 linhas (amostras) e 90 colunas (absorbâncias) e então aplicada PCA. As duas primeiras PCs explicam 91% da variação dos dados (PC1 81% e PC2 10%). Este valor foi superior ao observado para os demais modelos até aqui já discutidos. Na análise da PC1 observa-se a formação de dois grupos, um situado nos valores positivos da PC1 o qual são compostos pelas amostras correspondentes aos extratos de carvalho e jatobá, e outro situado nos valores negativos da PC1 formados pelos extratos de cabreúva-parda e amendoim como observado na Figura 20.

Figura 20- Gráfico de scores obtido a partir dos valores de absorbância dos espectros eletrônicos na região do UV-vis (220-400 nm).

A análise do gráfico de *loading* indica de forma clara que os comprimentos de onda próximos a 280 nm são os principais descritores para os extratos de carvalho e jatobá enquanto os comprimentos de onda próximos a 230 nm representam os principais descritores para as amostras de cabreúva-parda e amendoim (Figura 21).

Figura 21- Gráfico de loading gerado a partir dos valores de absorbância para os espectros eletrônicos das amostras de madeiras medidas entre 220-400 nm.

Como comentado anteriormente, os compostos fenólicos em sua maioria apresentam banda de absorção máxima próxima a 280 nm. Em resultados anteriores a análise de fenóis totais (método de Folin-Ciocalteu) indicou que os extratos de carvalho e jatobá foram os que apresentaram, dentre os diferentes extratos estudados, os maiores teores de fenóis totais. Os resultados anteriores⁶³ e os aqui coletados sugerem que o teor de compostos fenólicos influencia marcadamente nos espectros eletrônicos e, portanto, na definição dos clusters observados. Os baixos teores de vanilina ($\lambda_{\text{max}} = 232$ e 309 nm) e a alta concentração de cumarina ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm) em extratos de jatobá exemplificam esta tendência⁴⁹. O mesmo foi observado em relação à presença de ácido elágico ($\lambda_{\text{max}} = 280$ nm) nas amostras de carvalho.

Os extratos de madeiras como a cabreúva-parda e o amendoim, que apresentaram máximos de absorbância próximos a 230 nm, exibiram elevados teores dos aldeídos cinâmicos sinapaldeído e coniferaldeído⁴⁹. Tais aldeídos, possuem em seus perfis espectrais

duas bandas com máximos próximos a 240 e 309 nm como observado na Tabela 2. Estes compostos provavelmente devem ter influência na distinção desta amostras das demais analisadas.

Analisando os resultados obtidos pelo tratamento quimiométrico aos dados obtidos pelas três técnicas utilizadas (fingerprint cromatográfico, fingerprint do espectro de massas e espectro eletrônico) o modelo formulado a partir dos espectros eletrônicos apresentou-se como o mais promissor. Considerando-se também que o uso de espectrofotômetros de UV-vis envolve uma metodologia que tem por virtude características como simplicidade, baixo custo e rapidez, utilizando instrumentação extensamente difundida, robusta e de fácil manutenção, optou-se por desenvolver um método de identificação de madeiras com um grupo de amostra maior e também incluindo outras espécies de madeiras.

Foram então preparado 93 extratos de 10 tipos diferentes de madeiras as quais estão mencionadas na secção 3.2 , e coletados seus respectivos espectros. A aplicação da análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de cluster (HCA) e análise discriminante linear (LDA) a estes dados foi então utilizados para avaliar o potencial de distinção e classificação dos extratos de madeiras.

Os espectros de absorção dos extratos de madeiras apresentaram absorção na região do UV e intensidades variáveis ao longo faixa de 230-300 nm. Acima de 400 nm a absorção foi considerada desprezível para a análise em questão. A Figura 22 ilustra alguns espectros típicos de algumas amostras de extratos de madeiras e a Figura 22 as derivadas dos respectivos espectros. Para maior clareza, o número de espectros desta Figura foi reduzido a apenas cinco.

Figura 22- Exemplos dos espectros eletrônicos característicos de alguns extratos de madeiras analisados.

Figura 23- Valores da primeira derivada aplicada aos espectros eletrônicos da Figura 22.

As absorções na região de 250-290 nm indicam a presença de compostos aromáticos substituídos e de fenilpropanóides, típicos e bem conhecidos da estrutura da lignina⁷⁰, que são exemplificados no Esquema 3, na secção 1. Cabe ainda comentar o fato de que todos os extratos foram preparados a partir da mesma cachaça, a qual por si só não apresenta absorção substancial nesta faixa de comprimento de onda estudado (inferior a 0,010 Å). Esta cachaça foi então utilizada como referência. Portanto admitiu-se que toda a absorção observada era proveniente de compostos extraídos da madeira. Os melhores resultados para a análise da PCA foi obtido considerando-se apenas 7 tipos de madeiras. Esta opção foi tomada devido as limitações das interpretações nos dados gerados, e teve como critério de exclusão a escolha das espécies, considerar somente madeiras mais comumente utilizadas em tanoarias ou que apresentam interesse em relação a saúde do consumidor. Na análise de PCA para 53 extratos de 7 tipos de madeiras (carvalho, amendoim, amburana, bálsamo, jatobá, jequitibá e castanheira), os dados obtidos indicam que a somatória das 3 primeiras PC explicam 92% dos dados de variância (PC1 63% + PC2 19 % + PC3 10%).

O Gráfico de *scores* permitiu observar nitidamente o agrupamento de 6 espécies de madeiras, a exceção dos extratos de jequitibá. As amostras de jequitibá não apresentaram um perfil homogêneo nos valores de scores e se distribuíram ao longo dos eixos da PC1 e PC2 como observado na Figura 24 (PC1 vs PC2) e Figura 25 (PC1 vs PC3).

Figura 24- Gráfico de scores visualizados na PC1 vs PC2 para os extratos de madeiras obtidos a partir dos espectro eletronicos na faixa de 220-400 nm.

Figura 25- Gráfico de *scores* visualizados na PC1 vs PC3 para os extratos de madeiras obtidos a partir dos espectro eletronicos na faixa de 220-400 nm.

Uma explicação para esta observação pode estar relacionada com o fato de que as amostras correspondem a duas espécies do mesmo gênero (*Cariniana*) mas diferente espécies: jequitibá rosa (*Cariniana legalis*) e jequitibá branco (*Cariniana estrellensis*).

Cabe a menção de que em geral nas aguardentes envelhecidas em jequitibá não se especifica qual espécie utilizada, o que origina produtos com diferentes características sensoriais.

Quando se faz a análise do gráfico de loading considerando a PC1 e PC2, como na Figura 26, observa-se a distribuição dos comprimentos de ondas que caracterizaram os grupos observados no gráfico de scores na Figura 25. Nota-se ainda que a PC1 responde por 63% da explicação dos dados de variância ou seja, 63 % da explicação dos dados esta distribuido nesta direção. Observa-se que os valores positivos da PC1 estão correlacionados com as amostras de amburana, bálsamo, castanheira e carvalho e os valores negativos da PC1 com as amostras de amendoim, de jatobá e de jequitibá. Numa análise conjunta dos gráficos de loading e scores confirma-se que os comprimentos de onda próximos a 280 nm estão melhor correlacionados com os extratos de amendoim, jatobá e jequitibá e os comprimentos e onda próximos a 230 descrevem as amostra de amburana, bálsamo, castanheira e carvalho, conforme comentado anteriormente neste trabalho.

Figura 26- Gráfico de loading (PC1 vs PC2) para os dados espectrais dos extratos de madeiras obtidos no intervalo de 220-400 nm.

Em etapa subsequente os dados de absorbância tratados por análise de componentes principais (PCA) foram explorados por análise hierárquica de cluster (HCA). Utilizando-se toda a faixa espectral de 220-300 nm, os resultados comportaram-se similares aos observados na análise de PCA com exceção das referentes amostras de jequitibá.

Para esta espécie, a qual na PCA apresenta-se de forma espalhada nos gráficos de scores da Figura 25, um agrupamento foi observado no dendrograma de similaridade na análise de HCA. As amostras de jequitibá tendem a formar um cluster juntamente com amostras de amendoim considerando o nível de similaridade de 66%. Tal fato é interessante, pois aparentemente a análise hierárquica de cluster (HCA) mostra um maior poder de minimizar as diferenças entre as duas espécies de jequitibá, e maximizar a diferença das demais famílias, a exceção das amostras de extratos de amendoim. Por outro lado, a análise de

componentes principais (PCA) mostrou-se como mais eficaz a ponto de diferenciar a espécie dentro de um mesmo gênero.

De forma análoga ao observado na Figura 25, as amostra de carvalho e bálsamo, também se agrupam próximas na análise de cluster (Figura 27), originando dois grandes clusters no nível de similaridade de 20%.

Os melhores resultados de agrupamento foram observados para as madeiras jatobá, amburana e castanheira como se observa na Figura 26.

Figura 27- Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de cluster para os extratos de sete tipo de madeiras (carvalho, amendoim, amburana, bálsamo, jatobá, jequetibá e castanheira).

Com os resultados positivos observados nas análises de PCA e HCA, os quais caracterizam um modelo de análise exploratória, os resultados analíticos foram utilizados na elaboração de um modelo classificatório, utilizando a técnica de análise discriminante linear

(LDA). Duas matrizes foram construídas e analisadas a partir dos valores de absorvância coletados entre $\lambda = 220\text{-}300\text{ nm}$.

Os descritores considerados na análise discriminante linear foram os valores de absorvância que apresentaram os maiores valores de *loading* na análise exploratória de PCA.

Na aplicação de LDA para os extratos optou-se sempre pela análise de uma amostra específica em confronto com as demais (e.g. carvalho vs demais madeiras; amendoim vs demais madeiras). Portanto para cada modelo foi gerado uma equação linear na forma de $y = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$.

Na primeira abordagem utilizando somente os extratos de madeiras, foi montado um modelo de calibração formado por 67 amostras de extratos. Boa classificação foi observada para os extratos testados, principalmente para os extratos de castanheira (100% de acerto) e amburana (98% de acertos) como visto na Tabela 4. Após a criação do modelo de calibração foi-se testado conjunto de 26 amostras que foram utilizadas para o modelo de validação. Novamente as melhores porcentagens de acertos foram observados para os extratos de castanheira (99%) e amburana (98%). Em geral os modelos de validação apresentam porcentagem de acerto inferior frente a porcentagem de acerto de calibração (Tabela 4). Isto é atribuído ao fato de que o método de validação cruzada ser mais robusto devido a forma que se testa cada amostra do grupo de validação.^{60,61}

Tabela 4 Resultados obtidos para a classificação dos extratos de madeiras para os modelos de calibração e validação (validação cruzada).

Madeira	Número total de extratos	Modelo de calibração. Número de amostras	Modelo de calibração Classificação correta	Modelo de validação Número de amostras	Modelo de validação Classificação correta
Carvalho	13	10	95%	3	84%
Amendoim	8	6	82%	2	80%
Amburana	10	8	98%	2	98%
Bálsamo	12	9	91%	3	87%
Jatobá	9	7	89%	2	89%
Cabreúva-parda	8	6	78%	2	79%
Castanheira	12	10	100%	2	99%
Jequitibá	11	9	84%	2	81%
Canela sassafráz	5	3	82%	1	91%
Louro canela	5	3	73%	1	74%

Como uma extensão da aplicação do modelo de classificação proveniente da aplicação da LDA, foi testada sua capacidade de classificação utilizando-se agora cachaças comerciais envelhecidas em diferentes tipos de madeiras (ver apêndice 1). Para tanto se montou um modelo de calibração formado somente pelos extratos de madeiras (93 amostras) e um modelo de validação formado por cachaças (50 cachaças) foi estabelecido. O modelo de calibração foi formado por cachaças envelhecidas em função do tipo de madeira ficou assim distribuído: 9 cachaças de carvalho, 6 cachaças de amburana, 6 cachaças de amendoim, 10 cachaças de bálsamo, 2 cachaças de cabreúva-parda, 3 cachaças de canela-sassafráz, 5 cachaças de castanheira, 7 cachaças de jequitibá, 1 cachaça de louro-canela, 1 cachaça de jatobá.

Bons resultados observados nos acerto das cachaças comerciais envelhecidas foram observados (Tabela 5).

Excelentes resultados foram observados para as cachaças envelhecidas em tonéis de bálsamo, cabreúva-parda, canela-sassafráz e jequitibá, atingindo 100% de classificação correta. Cabe ainda aqui uma observação de que as cachaças envelhecidas em tonéis de jatobá e de louro-canela também aparecem na Tabela 5 com 100% de acerto, mas o resultado é somente ilustrativo, pois uma amostra somente não pode ser considerada estatisticamente representativa.

Tabela 5- validação-cruzada para classificação de cachaças comerciais envelhecidas em diferentes tipos de madeiras.

Cachaça envelhecida (tipo de madeira)	Número de cachaças testadas	Classificação correta
Carvalho	9	88%
Amendoim	6	80%
Amburana	6	83%
Bálsamo	10	100%
Jatobá	1	100%
Cabreúva-parda	2	100%
Castanheira	5	80%
Jequitibá	7	100%
Canela sassafráz	3	100%
Louro canela	1	100%

Os resultados obtidos na classificação das cachaças envelhecidas em tonéis de castanheira e de amburana, não repetiram o mesmo desempenho observado no modelo contendo somente extratos. Fatores como tempo de envelhecimento, uso de tonéis para descanso da aguardente, histórico dos tonéis não foram abordados nestas análises e

provavelmente devem auxiliar a melhor explicar a divergencia destes resultados. Estes itens são objetos de estudo em nosso Laboratório.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Três técnicas foram utilizadas neste trabalho com a finalidade de identificar extratos de madeira. A identificação de compostos fenólicos utilizando cromatografia de fase líquida hifenada a detectores espectrofotométricos, embora bem estabelecida, carece de cuidados e atenção quanto à identificação de compostos fenólicos em matrizes complexas. A grande variedade de moléculas que apresentam absorção de luz em regiões semelhantes do espectro UV-vis, a eventual presença de isômeros e a baixa resolução do cromatograma em matrizes complexas são alguns dos aspectos que podem conduzir a uma identificação equivocada.

Por exemplo, a ausência de epicatequina nos extratos de madeiras, sugerida pela análise dos cromatogramas utilizando HPLC-DAD-Fluorescência, só pode ser elucidada através das análises realizadas em HPLC-ESI-MSⁿ analisando-se os fragmentos gerados nos modos positivo e negativo. A ausência do trans-resveratrol, do ácido serínico e da quercetina nestes extratos também foram confirmadas utilizando-se esta última técnica. O uso da cromatografia para fase líquida acoplada a espectrometro de massas também foi útil para solucionar problemas de coeluição observados para compostos como ácido gálico e elágico.

A aplicação de análise discriminante linear a dados espectrais permitiu construir modelos que possibilitam classificar os extratos e também cachaças comerciais que mantiveram contato com tonéis de madeira. Os resultados para a classificação de cachaças e de extratos se verificou com acertos de 80% (bálsamo e amendoim) a 100% (castanheira e amburana).

O uso do fingerprint cromatográfico, mostrou-se uma importante ferramenta na análise dos extratos. Embora o fingerprint cromatográfico tenha nos estudos empregando PCA resultados inferiores aos obtidos na análise do espectro eletrônico por esta mesma técnica quimiométrica, esta metodologia mostrou-se importante pois permitiu apontar possíveis

compostos que possam atuar como biomarcadores das espécies de madeiras. Como exemplos de possíveis discriminadores temos a cumarina para os extratos jatobá, o ácido elágico para os extratos de carvalho e o 5-HMF para os extratos de amendoim. Trata-se de metodologia recomendada por organizações como WHO, FDA e EMEA para o reconhecimento de padrões. O tempo de análise e o custo desta, o tratamento quimiométrico mais laborioso são pontos que devem ser considerados quando se deseja utilizar o fingerprint cromatográfico.

O emprego do fingerprint do espectro de massas apresenta características similares aos do fingerprint cromatográfico como: o custo, a operação, e a experiência profissional são fatores importantes quando se opta por uma metodologia. A difusão de instrumentação de alto custo apenas em laboratórios bem específicos e em locais de acesso relativamente restritos como áreas de fronteira, ou em avaliações *in loco* como no caso de organizações certificadoras de bebidas demandam metodologias mais simples e acessíveis.

O uso do espectro eletrônico na região do UV-vis demonstrou ser uma excelente ferramenta para aferição da identidade da madeira empregada na confecção de tonéis utilizados para armazenagem de bebidas. Algumas vantagens como: uso de instrumentação de baixo custo e extremamente difundida, fácil manipulação, rapidez e robustez tornam esta metodologia uma opção para auxiliar na certificação da cachaça envelhecida. Embora o presente estudo tenha a aguardente como foco, as conclusões aqui obtidas podem ser extendidas para outros destilados. Outra possível aplicação seria a análise de espécies vegetais relevantes para o comércio de madeira e no controle da extração ilegal de espécies controladas.

Estamos presentemente trabalhando na aplicação dos métodos até então desenvolvidos para o estudo de reações que se processem nos extratos de madeiras em função do tempo. A análise dos extratos ao longo de seu envelhecimento mesmo quando armazenados em recipientes inertes (recipientes de vidro) podem vir a permitir a proposição de marcadores de

envelhecimento. Tais marcadores seriam de grande importância para o monitoramento do tempo de envelhecimento e portanto permitindo uma atribuição mais confiável do período de guarda.

5. REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

1. OWENS, B.; DIKTY, MAYTAG, F. **The Art of Distilling Whiskey and Other Spirits: An Enthusiast's Guide to the Artisan Distilling of Potent Potables**, Massachussets, Quarry Books, 2009, 185 p.
2. MCGOVERN, P. E. **Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture**. United Kingdom, Oxforshire, Princetom University Press, 2003. 400 p.
3. LEE, M.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R. Origins of Flavour in Whiskies and a Revised Flavour Wheel: a Review **Journal of The Institute of Brewing**, v. 107, n 5, p. 287-313, 2001.
4. FREGONI, M.; Professor Doutor de Viticultura e Diretor do Istituto di Frutti-Viticultura, Italia, comunicação pessoal.
5. NISHIMURA, K.; MATSUYAMA, R. Em: **Maturation and Maturation Chemistry**; PIGGOTT, J. R. ed.; Longman: London, 1989, cap. 7.
6. PIGGOTT, J. R.; CORNNER, J. M.; PATERSON, A.; CLYNE, J. Effects on Scotch whisky composition and flavour of maturation in oak casks with varying histories. **International Journal of Food Science and Technology** , v. 28, p. 303–318, 1993.
7. LIMA, U. A. **Aguardente: fabricação em pequenas destilarias**. Editora Fealq: Piracicaba, 1999, p. 176.
8. ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A; BELLUCO, A. E. S. Aspectos da composição físico-química e aceitação sensorial de aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 226-232, 2010.
9. HAGAN, E. C.; JENNER, P. M.; JONES, W. I.; FITZHUCH, O. G.; LONG, E. L.; BROUWER, J. G.; WEBB, W. K. Toxic properties of compounds related to safrole. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 7, p. 18-24, 1965.
10. LOTLIKAR, P. D.; MICHAEL B. WASSERMAN, M. B. Effects of Safrole and Isosafrole Pretreatment on N- and Ring-Hydroxylation of 2-Acetamidofluorene by the Rat and Hamster. **Biochemical Journal**, n. 129, p. 937-943, 1972.

11. DA 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**, n. 32, p. 3681-3691, 2009.
12. ZACARONI, L. M.;Cardoso, M. G.;SACZK, A. A.;DE MORAES, A. R.;DOS ANJOS, J. P.;Machado, A. M. R.;NELSON, D. L. Determination of Phenolic Compounds and Coumarins in Sugar Cane Spirit Aged in Different Species of Wood, **Analytical Letters**, v. 44, n. 12, p. 2061-2073, 2011.
13. DE MELLO, Mirian Marcolan. **Desenvolvimento de uma metodologia por espectroscopia de fluorescência para identificação de cumarina e 7-hidroxycumarina em drágeas e soro sintético. 2009. 137 f.** (Dissertação de mestrado). Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2009.
14. KARTE, B. S. A. J.; HOTCHKISS, S. A. M.;CAPEL, M. Comparative *in vitro* skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-Benzopyrone) in humam, rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 145, n. 1, p 34-42. 1997.
15. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 2**, de 15 de janeiro de 2007.
16. LAKE, B. G.. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423–453. 1999.
17. BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa nº 13, de 29/6/2005, **Diário Oficial da União**, 30/06/2005, seção 1, p. 3.
18. LANG, J. W. Blending for sale and consumption. In: PIGGOTT, J. R. (ed.): **Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development**, Ellis Horwood Ltd, 1983, p. 256–263.
19. CHATONNET, P. Discrimination and control of toasting intensity and quality of oak wood barrels. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 4, p. 479–494, 1999.
20. CONNER, J. M.;PIGGOTT, J. R.;PATERSON, A. Analysis of lignin from oak casks used for the maturation of Scotch whisky. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, p. 349–353, 1993.

21. GALINARO, C. A.;FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Química Nova, São Paulo**, v. 32, n. 6, p. 1447-1451, 2009.
22. CAMPOS, J. O. S.;AQUINO, F. W. B.;NASCIMENTO, R. F.;COSTA, J. G. M.;KEUKELEIRE, D.;CASIMIRO, A. R. S. Influence and effect of thermal treatment in elaboration of regional wood extracts for cachaça. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 179–185, 2004.
23. CHATONNET, P. ;DUBOURDIEU, D. Identification of substances responsible for the ‘sawdust’ aroma in oak wood. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , n.76, p.179–188, 1998.
24. CONNER, J. M.;PATERSON, A.;PIGGOTT, J. R. Changes in wood extractives from oak cask staves through maturation of Scotch malt whisky. **Journal of the Science of Food and Agriculture** , n. 62, p. 169–174, 1995.
25. DIAS, S. M. B. C.;MAIA, A.;NELSON, D. L. Efeito de diferentes madeiras sobre a composição da aguardente de cana envelhecida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, 331–334, 1998.
26. DE MIRANDA, M. B.; MARTINS, N. G. S.; BELLUCO, A. E. S.;HORIL, J.; ALCARDE, A. R. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho.**Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, n. 28, p. 84-89, 2008.
27. PARAZZI, C.;ARTHUR, C. M.;LOPES, J. J. C.;BORGES, M. T. M. R. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus. sp.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.
28. LEE, M.; PATERSON, A.;PIGGOTT, J. R..Origins of Flavour in Whiskies and a Revised Flavour Wheel: a Review. **Journal of The Institute of Brewing**, v.107, n. 5, 2001.
29. CHATONNET, P.;DUBOURDIEU, D. Identification of substances responsible for the ‘sawdust’ aroma in oak wood. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 179–188, 1998.

30. DE SOUSA, I. C. R. B.; BELCHIOR, A. P.; CLÍMACO, M. C.. A sensory and chemical approach to the aroma of wooden aged lourinhã wine brandy, **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23, n. 2, p. 97-110, 2008.
31. STONE, H.; SIDEL, J..Sensory evaluation practices. New York: **Academic Press**, 1993. 2ed., 338p.
32. ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; DA SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1839-1844, 2009.
33. CALDEIRA, I.; CANAS, S.; COSTA, S.; CARVALHO, E.; BELCHIOR, A. P..1999. Formação de uma câmara de prova organoléptica de aguardentes velhas e selecção de descritores sensoriais.**Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 14, n. 1, p. 21-30, 1999.
34. CARDELLO, H. M. A. B.;FARIA, J. B..Análise descritiva quantitativa da aguardente de Cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba L.*).**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 2, 1998.
35. CARDELLO, H. M. A. B.;FARIA, J. B..Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2000, v.20, n.1, p. 32-36, 2000.
36. MEILGAARD, M.;CIVILLE, G. V.;CARR, B. T.**Sensory Evaluation Techniques**, Boca Raton, 3 ed., CRC Press, 1999, 342 p.
37. Associação Brasileira de Normas Técnicas; NBR 12994: **Análise sensorial dos alimentos e bebidas**, Rio de Janeiro, 1993.
38. FARIA, J. B.;CARDELLO, H. M. A. B; BOSCOLO, M.; ISIQUE, W. D; ODELLO, L.; FRANCO, D. W. Evaluation of Brazilian woods as an alternative to oak for cachaças aging. **European Food Research and Technology**, v.218, n. 83, p. 83-87, 2003.
39. HALUK, J.-P.; IRMOULI, M. The fixed polymer constituents in cooperage oak: cellulose, hemicelluloses and lignin. **Journal of Cooperage Sciences and Techniques**, v. 4, p. 43-82, 1998.

40. MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science e Technology**, v.9, n.3, p. 95-101, 1998.
41. GAY, M.; APETREI, C.; NEVARES, I.; DEL ALAMO, M.; ZURRO, J.; PRIETO, N.; DE SAJA, J. A.; MÉNDEZ, M. L. R. Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 22, p. 6782-6788, 2010.
42. CARDOSO, D. R.; SOBRINHO, L. G. A.; NETO, B. S. L.; FRANCO, D. W.. A Rapid and Sensitive Method for Dimethylsulphide Analysis in Brazilian Sugar Cane Sugar Spirits and Other Distilled Beverages. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 277-281, 2004.
43. SINGLETON, V. L. Maturation of Wines and Spirits: comparisons, Facts, and Hypotheses. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 1, p. 98-115, 1995.
44. DOS ANJOS, J. P.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; ZACARONI, L. M.; SANTIAGO, W. D.; DÓREA, H. S.; MACHADO, A. M. R. Identificação do carbamato de etila durante o armazenamento da cachaça em tonel de carvalho (*Quercus* sp) e recipiente de vidro. **Química Nova**, v. 34, n. 5, 874-878, 2011.
45. ANJOS, J. P.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; DÓREA, H. S.; SANTIAGO, W. D.; MACHADO, A. M. R.; ZACARONI, L. M.; NELSON, D.L.. Evolution of the concentration of phenolic compounds in cachaça during ageing in an oak (*Quercus* sp.) barrel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1307-1314, 2011.
46. PARAZZI, C.; ARTHUR, C. M.; LOPES, J. J. C.; BORGES, M. T. M. R.. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p. 193-199, 2008.
47. KAHN, J. H ; SHIPLEY, P. A; LAROE, E. G.; CONNER, H. A. Whisky composition: Identification of additional components by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Food Science**, v.34, p. 587-591, 1969.
48. DA 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.

49. REEDER, B.J.; WILSON, M.T. Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hydroperoxyoctadecadienoic acid, **Biochemical Journal**, n. 330, p. 1317–1323, 1998.
50. BECKER, E. M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 19, n. 6, p.561–571, 2004.
51. CARDOSO, D. R.; FREDERIKSEN, A. M.; DA SILVA, A. A.; FRANCO, D. W.; SKIBSTED, L. H.. Sugarcane spirit extracts of oak and Brazilian woods: antioxidant capacity and activity. **European Food Research and Technology**, v.227, n. 4, p.1109-1116, 2008.
52. FERREIRA, Rafael Queiroz. **Desenvolvimento e aplicação~de um novo ensaio para determinação eletroquímica da atividade antioxidante de compostos modelo e de matrizes complexas**. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Fisico-Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
53. DE SOUZA, P.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, D. V.; B. NETO, W. B.; AMORIM, V. M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaca Aged in Different Wood Casks. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p.2094-2102, 2007.
54. Identificação macroscópica de madeiras, produzido por: Geraldo José Zenide, disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABt68AI/identificao-madeiras-ipt.pdf>>, acessada em Junho 2011.
55. FERREIRA, Gracilda. Costa. **Modelagem ambiental de espécies de árvores no Vale do Jari, Monte Dourado, Pará usando dados do inventário florestal**. 2009, 204 f. Tese (Doutorado em Botânica) Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico, Rio de Janeiro, 2009.
56. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.
57. BOSCOLO, M.; ANDRADE SOBRINHO, L. G ; LIMA NETO, B. S.; FERREIRA, M. M. C.; FRANCO, D. W. Spectrophotometric Determination of Caramel Content in Spirits Aged in Oak Casks. **Journal of AOAC International**, v.85, n. 3, p.744-750, 2002.

58. BEEBE, K. R., Pell, R. J., SEASHOLTZ, M. B., **Chemometrics, A Practical Guide**, A Wiley Interscience publication, New York, USA 1998, 254 p.
59. ESBENSEN, K. H., **Multivariate Data Analysis- In Practice**, Alborg University, Esbjerg, Camo Software, 5 ed., 2006. 594 p.
60. SKOV, T.; VAB DEN BERG; F., TOMASI, G., BRO, R. Automated alignment of chromatographic data. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 484–497, 2006.
61. DA SILVA, A. A. **Compostos fenólicos em madeiras brasileiras**. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e da Terra-Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 2006.
62. RUIZ, D.; EGEA, J.; GIL, I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization and Quantitation of Phenolic Compounds in New Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9544-9552, 2005.
63. FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3570-3585, 2002.
64. NIEMEYER, E.D.; BRODBELT, J. S. Isomeric Differentiation of Green Tea Catechins using Gas-Phase Hydrogen/Deuterium Exchange Reactions. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v.18. n.10, p. 1749-1753, 2007.
65. MAMMELA, P.; SAVOLAINEN, H.; LINDROOS, L.; KANGAS, J.; VARTIAINEN, T. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 891, n. 1, p. 75-83, 2000.
66. ES-SAFI, N.-E.;FULCRAND, H.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNE, M. Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde- induced polymerization of flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 5, p. 2088-2095, 1999.
67. DE SOUZA, P. P. SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, D.V.; NETO, W. B.; AMORIM, V. M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian artisan cachaça aged in different wood casks. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p.2094-2102, 2007.

68. LUQUE-RODRIGUEZ, J. M.; PÉREZ-JUAN, P.; D. LUQUE DE CASTRO, M. Extraction of Polyphenols from Vine Shoots of *Vitis vinifera* by Superheated Ethanol–Water Mixtures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8775-8781, 2006.

ANEXOS

ANEXO I

Campanari (amburana), Maccari (amburana), Maccari (balsamo), Maccari (cabreuva), Maccari (jequitibá), Maccari (sassafrás), Garrafa 35 mês (carvalho), Garrafa 8 anos (carvalho), bosco (Amendoim), Obaina (carvalho), Acqua benta (louro/balsamo), Canabella (jequitibá), Embauba (jequitibá), Kullys (amburana), Reserva do capitão (amendoim), Samanu (carvalho), Engenho Vertente (carvalho), Sirigaita Canário (carvalho), Canelado de Prosa (louro), Verde amarela (jequitibá), Ginga Brasil (carvalho), Mirahy (carvalho), Dona Carolina (amendoim), Dona Carolina (balsamo), Vereda Tropical (balsamo), Aroma Brasil (castanheira), Branquinha de Minas (castanheira), Dona Carolina (castanheira), Dona Carolina (amburana), Fazenda Jeremias (amburana), Seleta (amburana), 3 Garças (castanheira), Douglas garrafa 2006 (jequitibá rosa), Elisa amendoim 28 2010 (amendoim), São Luiz 61 2010 (amendoim), Aroma Brasil (amburana), Campanari (amendoim), Elisa (amendoim), Aroma Brasil (balsamo), Ginga (canela sassafrás), B (canela sassafrás), Aroma Brasil (jequitibá rosa), Velho Ferreira (jequitibá), Boazinha (balsamo), Furadinha (balsamo), Pascoal (castanheira), Benvinda (jequitibá), Campanari (carvalho francês), Campanari (carvalho americano), João Mendes (carvalho).

Estas amostras foram obtidas junto a ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas) ou em alguns casos fornecidas gentilmente pelos produtores.